

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude du contrôle de la différenciation épidermique dans des kératinocytes cultivés en suspension: rôle du récepteur de l'EGF et des récepteurs de sa famille

FOCROUL, Caroline

Award date:
2003

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

**Etude du contrôle de la différenciation épidermique dans des kératinocytes
cultivés en suspension : rôle du récepteur de l'EGF et des récepteurs de sa
famille.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Caroline FOCROUL
Juin 2003

Etude du contrôle de la différenciation épidermique dans les kératinocytes cultivés en suspension : rôle du récepteur de l'EGF et des récepteurs de sa famille.

FOCROUL Caroline

Résumé

L'épiderme humain est un tissu dynamique dont l'homéostasie est maintenue grâce à un équilibre entre la prolifération des kératinocytes de la couche basale et la différenciation puis la desquamation des kératinocytes de la couche cornée. Cet équilibre implique un contrôle du taux de prolifération, ainsi qu'un contrôle du taux de différenciation par l'intermédiaire notamment de facteurs de croissance. Notre travail s'est intéressé particulièrement au rôle du récepteur de l'EGF et aux récepteurs de sa famille dans des kératinocytes cultivés en suspension afin d'étudier des cellules qui ont perdu leur ancrage à la matrice extracellulaire. La première partie de notre étude a démontré que les effets biologiques de l'activation du récepteur de l'EGF diffèrent en présence ou non d'une adhésion des kératinocytes épidermiques à la matrice extracellulaire. Dans des kératinocytes cultivés en suspension, l'activation du récepteur de l'EGF favorise la différenciation épidermique induite par la perte d'adhésion à la matrice extracellulaire, via une augmentation de l'expression de marqueurs de différenciation tardive (involucrine), ainsi qu'une réduction de l'expression des marqueurs de cellules basales (sous-unité d'intégrine $\alpha 6$), de cellules non différenciées (K14) et de cellules en différenciation précoce (K10). Dans la deuxième partie de notre étude, nous nous sommes intéressés au rôle des récepteurs de l'HRG dans ces mêmes conditions de suspension des kératinocytes épidermiques. Nos résultats ont suggéré que les récepteurs HER2 ne sont pas activés par l'HRG et le marquage en immunofluorescence des kératinocytes cultivés en suspension a montré une distribution intracytoplasmique de ces récepteurs. La localisation des récepteurs HER3, ainsi que l'étude de son activation est une perspective à envisager afin d'améliorer notre compréhension sur le système héroguline-récepteurs dans des kératinocytes cultivés en suspension.

Remerciements

Au terme de ces quelques mois passés dans le département d'Histologie-Embryologie, j'aimerais remercier Monsieur le Professeur Y. Poumay pour m'avoir accueillie avec beaucoup de bienveillance dans son département et qui, par ses grandes compétences, m'a toujours judicieusement conseillée.

J'exprime mes remerciements les plus sincères à :

Madame F. de Boch-Kemper-Herphelin pour son aide plus que précieuse, sa disponibilité, sa bonne humeur et l'intérêt qu'elle m'a témoigné tout au long de mon travail.

Monsieur le Professeur M. Herin pour ses conseils et son assistance à la réalisation du travail photographique.

Monsieur P. Glesner pour son aide technique.

Messieurs R. Déom et D. Van Vlaenders pour leurs conseils et leur sympathie.

Messieurs R. Jans, F. Dupont et Mademoiselle G. Atanasova pour leur disponibilité et leur gentillesse.

J'exprime également toute ma reconnaissance aux membres du département de microscopie électronique pour m'avoir accueillie avec beaucoup de sympathie ainsi qu'à toutes les personnes qui m'ont soutenue et encouragée tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier vivement mes parents pour m'avoir permis de réaliser les études qui me tenaient à cœur ainsi que mon compagnon pour m'avoir aidée, soutenue et encouragée.

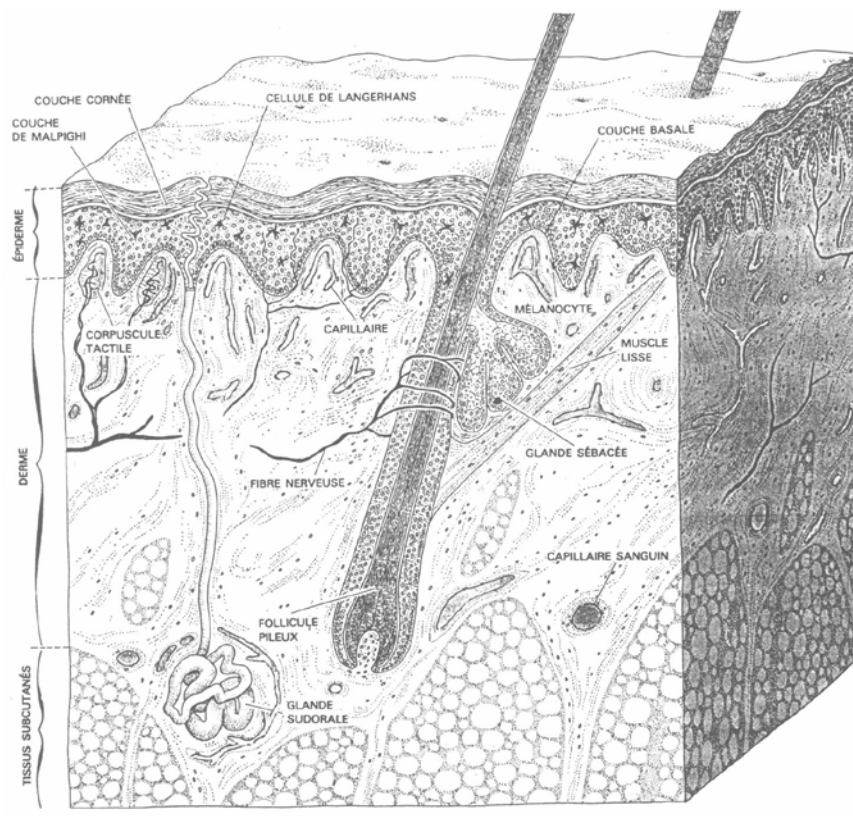


Figure I.1. : schéma en trois dimensions de la structure de la peau (Thivolet, 1986).

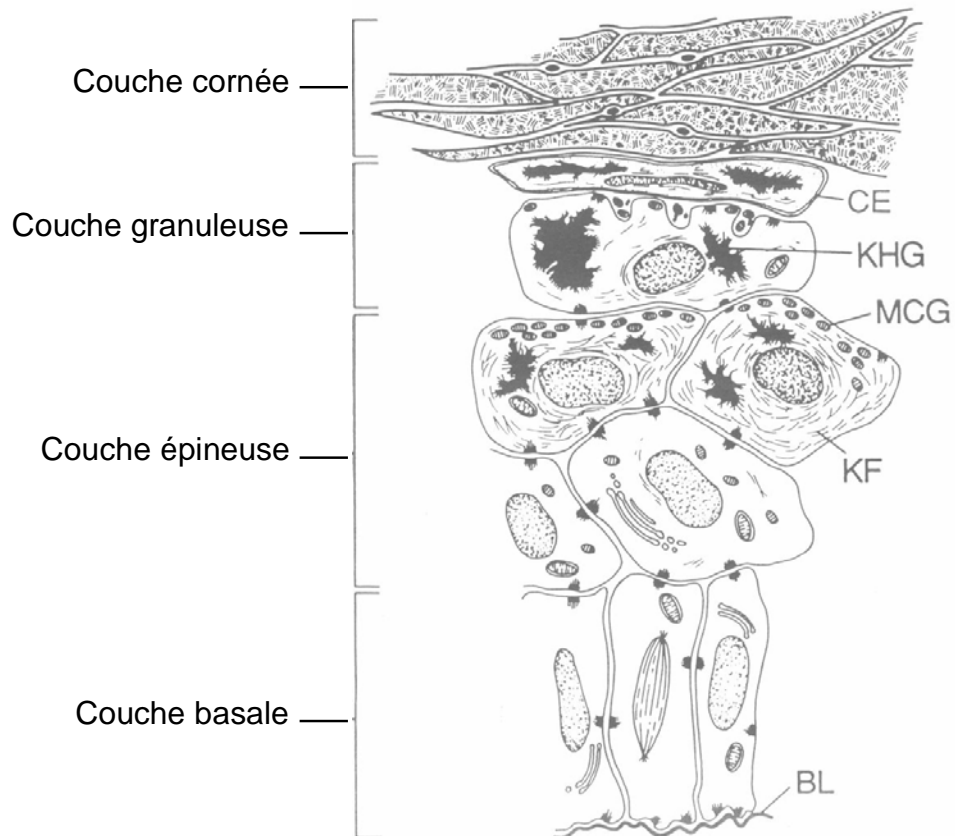


Figure I.2. : organisation de l'épiderme en quatre couches superposées morphologiquement distinctes de la profondeur vers la surface et reflétant l'évolution du processus de différenciation épidermique (Farmer et Hood , 1990). BL : lame basale. KF : filaments de kératine. MCG : corps d'Odland. KHG : granule de kératohyaline. CE : enveloppe cornée.

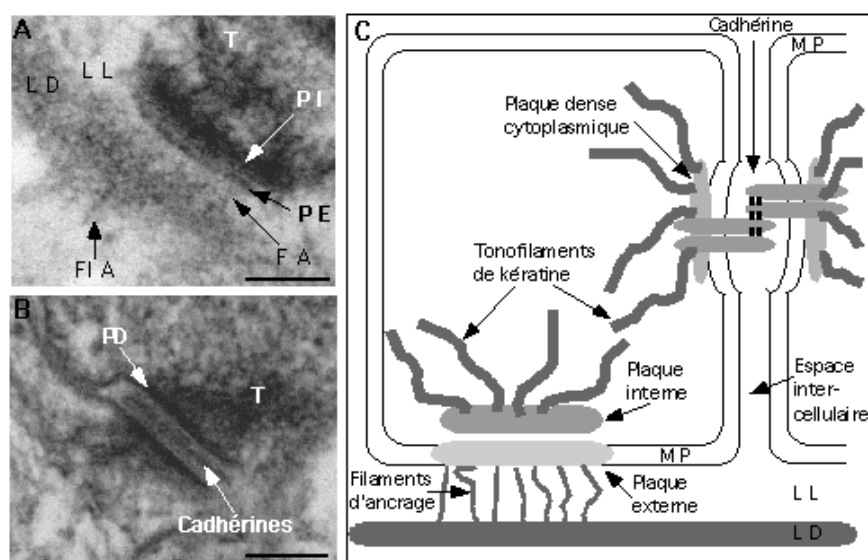


Figure I.3. : représentation schématique des hémidesmosomes reliant les kératinocytes de la couche basale au derme et les desmosomes reliant les kératinocytes des couches basales et suprabasales entre eux. A : En microscopie électronique à transmission, l'hémidesmosome apparaît comme un épaississement local de la membrane plasmique du pôle basal d'un kératinocyte de la couche basale. Les tonofilaments de kératine (T) s'associent aux composants cytoplasmiques de l'hémidesmosome au niveau de la plaque interne (P I). Les éléments transmembranaires s'organisent en plaque externe (P E) au niveau de la membrane plasmique et relient le kératinocyte à la lamina densa (L D) du derme sous-jacent via les filaments d'ancrage (F A) composés notamment de laminine 5 et localisés dans la lamina lucida (L L). Finalement, la lamina densa s'ancre dans le derme via les fibrilles d'ancrage (F I A) composées essentiellement de collagène VII. La barre d'échelle représente 100 μ m.

B : En microscopie électronique à transmission, le desmosome apparaît également comme un épaississement membranaire. Les tonofilaments de kératine (T) s'associent à la plaque dense cytoplasmique (PD) contenant la desmoplakine et la plakoglobine. Les plaques denses de deux kératinocytes contigus s'associent via les interactions homophiliques calcium dépendantes mises en place par les cadhérines transmembranaires (desmocollines et desmogléines). La barre d'échelle représente 100 μ m. C : Schéma représentant les hémidesmosomes reliant les kératinocytes de la couche basale au derme et les desmosomes reliant les kératinocytes des couches basales et suprabasales entre-eux.

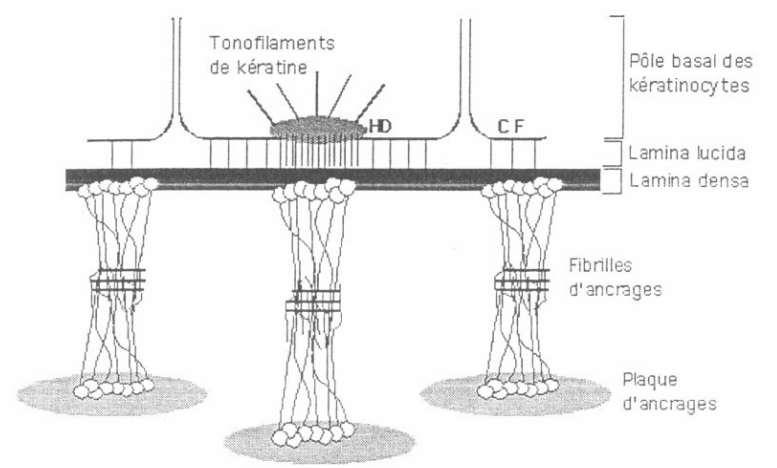


Figure I.4. : Les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme sont ancrés au derme par l'intermédiaire de la jonction épidermo-dermique. HD : hémidesmosome. CF : contact focal
Schéma inspiré de Burgeson et Christiano (1997).

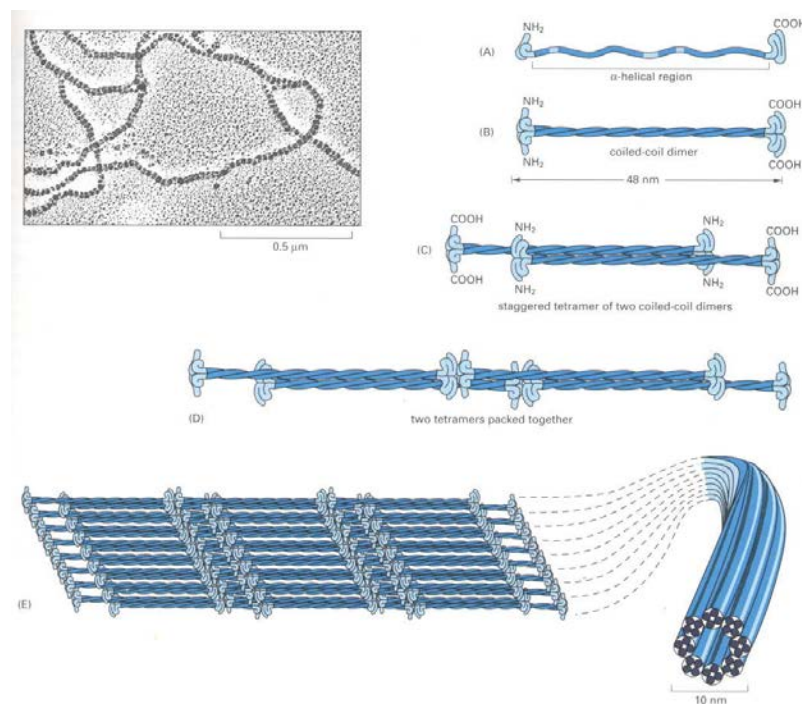


Figure I.5. : schéma représentant l'assemblage et l'architecture du filament intermédiaire. Deux monomères (A) s'associent pour former un dimère (B). A leur tour, les dimères s'associent en tétramères (C). Les tétramères constituent les unités de base pour l'assemblage du protofilament de kératine (E). (Alberts et al., 1994).

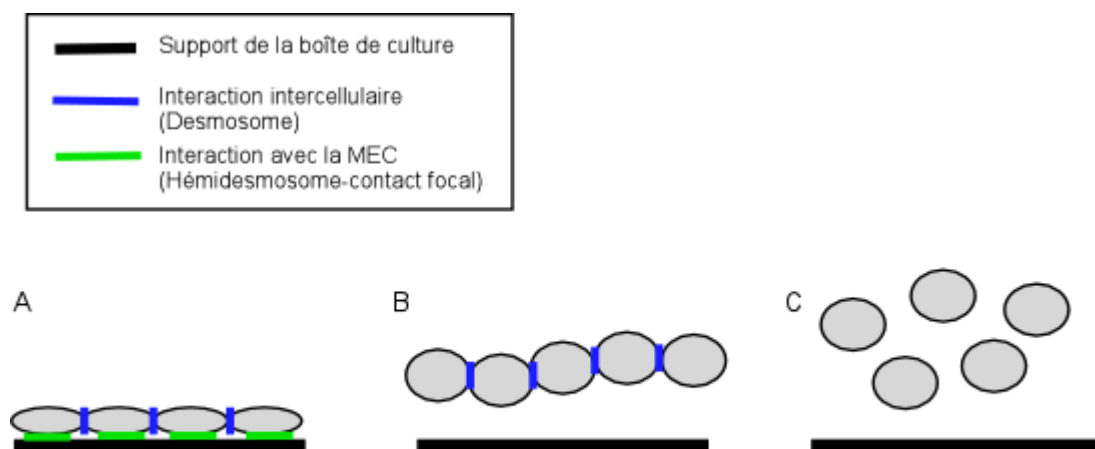


Figure I.6. : schéma représentant les modèles de culture des kératinocytes épidermiques humains. A : culture de kératinocytes épidermiques adhérents présentant des cellules de forme aplatie et interagissant entre elles par l'intermédiaire des desmosomes et avec la matrice extracellulaire par l'intermédiaire des hémidésmosomes et contacts focaux. B : En présence d'une concentration en calcium de 1 mM, les kératinocytes en suspension présentent une forme plutôt arrondie et interagissent entre eux par l'intermédiaire des desmosomes. C : En présence d'une concentration en calcium de 0,06 mM, les kératinocytes en suspension présentent une forme plutôt arrondie et n'établissent pas de jonctions intercellulaires.

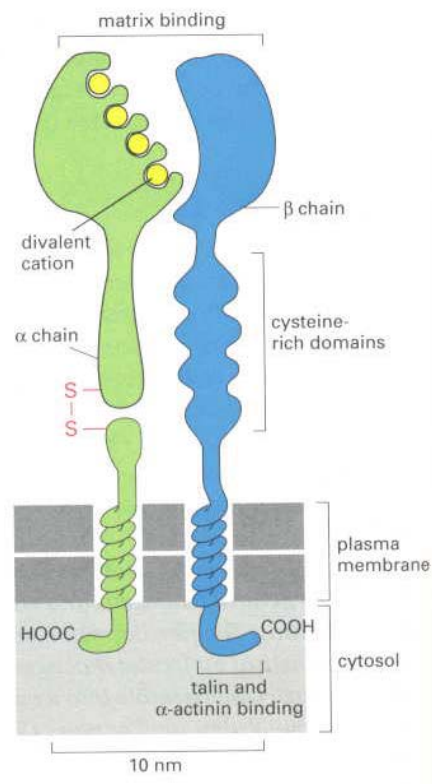


Figure I.7. : schématisation de la structure d'une intégrine. La plus grande partie de chaque sous-unité est localisée du côté extracellulaire de la membrane. La sous-unité β possède le site de liaison RGD qui reconnaît les matériaux extracellulaires. Les ions calcium, qui sont nécessaires aux activités de liaison des intégrines, s'unissent aux quatre motifs de liaison aux cations de la sous-unité α . (Alberts et al., 1994).

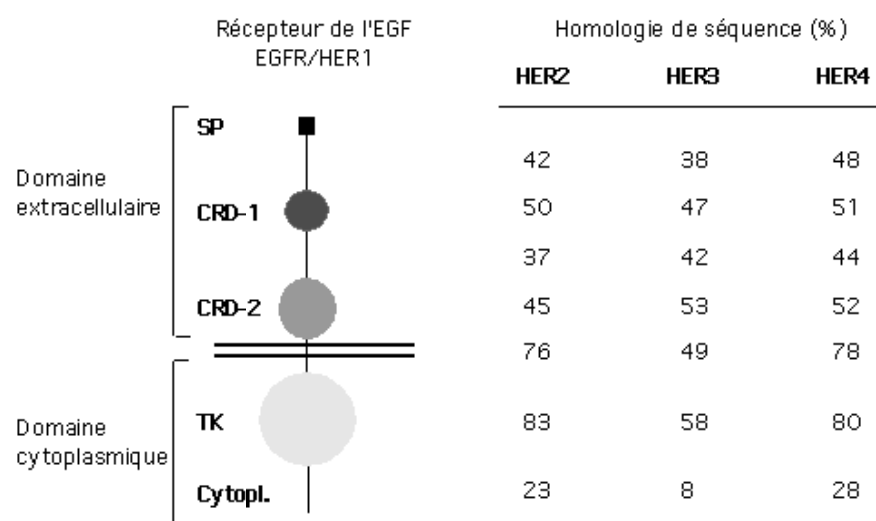


Figure I.8. : représentation schématique de la structure des récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille des HER. CRD : domaine riche en résidus cystéine. SP : peptide signal. TK : domaine tyrosine kinase. Figure adaptée de Peles et Yarden (1993).

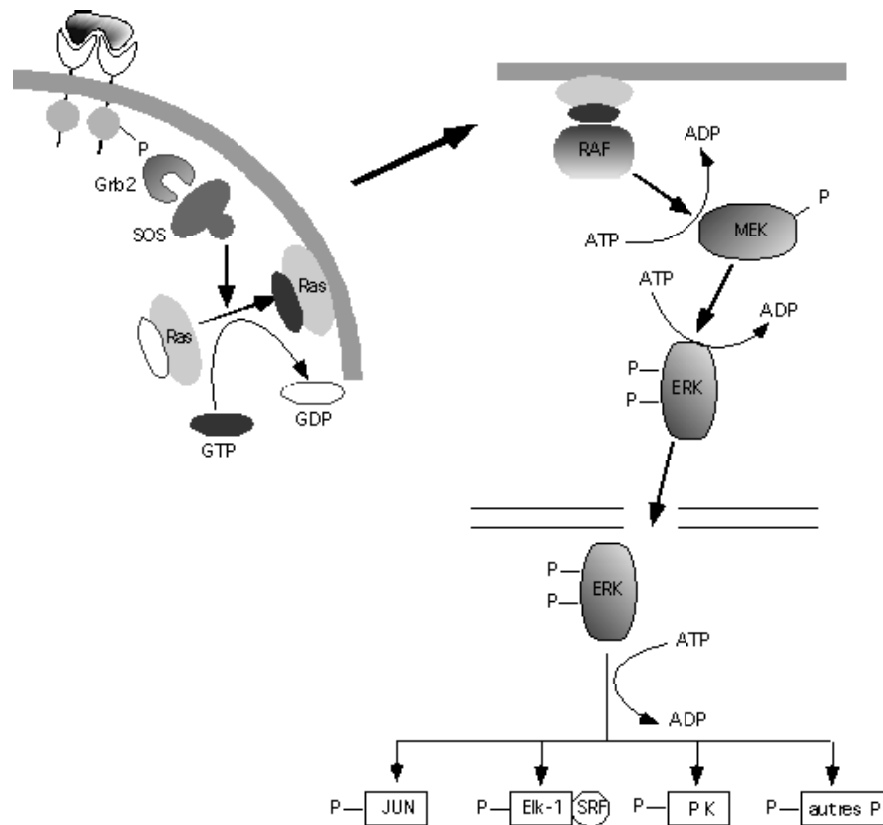


Figure I.9. : La voie des MAPK/ERK est une voie de signalisation cellulaire utilisée par tous les récepteurs de la famille des HER. Après activation de leur domaine tyrosine kinase, les récepteurs transmembranaires de la famille des HER initient différentes voies de la transduction du signal selon l'identité des récepteurs impliqués. Parmi ces voies, la voie des MAPK est utilisée par tous les récepteurs de la famille des HER. Après activation des récepteurs HER, les résidus tyrosine phosphorylés vont recruter Grb2, une protéine adaptatrice cytoplasmique possédant un domaine SH2 de liaison aux tyrosines phosphorylées et deux domaines SH3 responsables du recrutement de SOS. SOS, une guanine nucleotide exchange factor, va stimuler l'échange du GDP en GTP sur la protéine Ras. Ras ainsi activé va recruter RAF(MAPKKK) dans le voisinage de la membrane. RAF phosphoryle et active MEK(MAPKK) qui a son tour va phosphoryler ERK(MAPK) sur des résidus tyrosine et thréonine. ERK activé est transloqué dans le noyau où il va phosphoryler différentes protéines intervenant dans la réponse terminale de la cellule à la stimulation par le facteur de croissance.

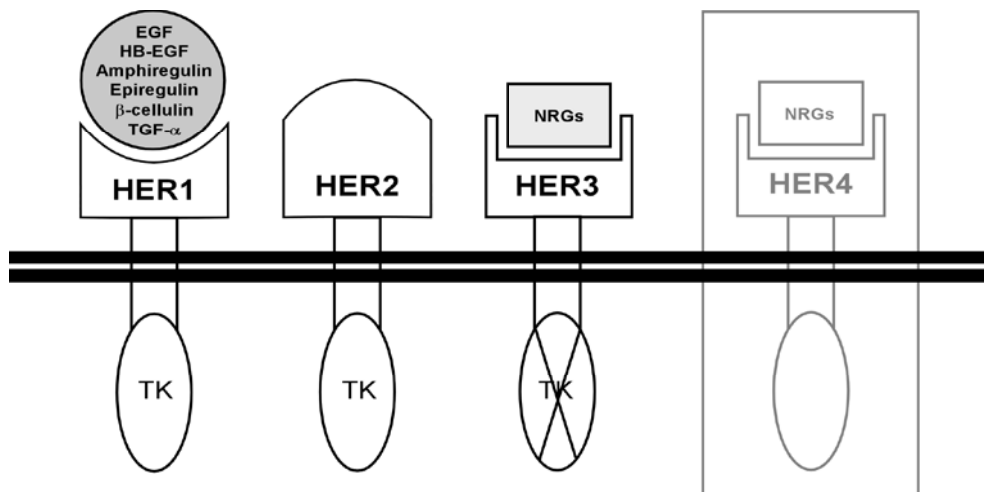


Figure I.10. : représentation schématique des récepteurs tyrosine kinase de la famille des HER. Le récepteur HER1 interagit avec les facteurs de croissance de l'EGF. Le récepteur HER2 n'a pas de ligand connu. Le récepteur HER3 interagit avec les facteurs de croissance de la famille des Neurégulines (NRGs) et possède une activité tyrosine kinase (TK) déficiente. Le récepteur HER4 interagit avec les facteurs de croissance de la famille des Neurégulines (NRGs) et n'est pas exprimé dans l'épiderme.

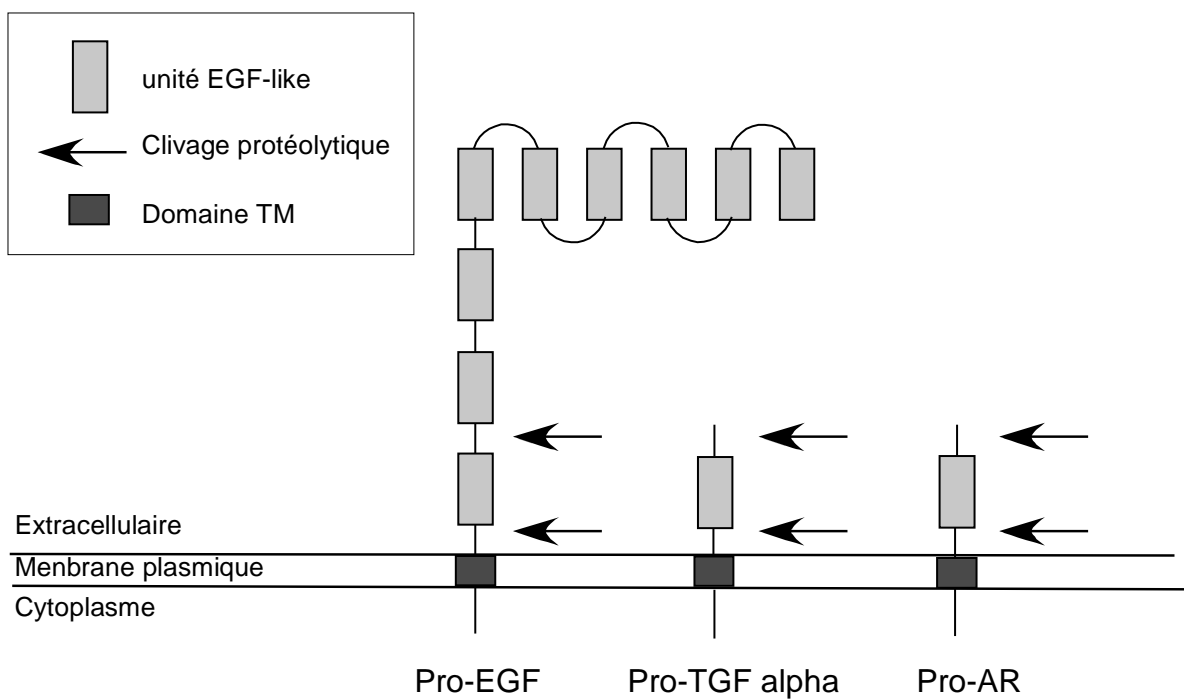


Figure I.11. : représentation schématique de la structure des facteurs de croissance de la famille de l'EGF. Schéma inspiré de Harris et al. (2003).

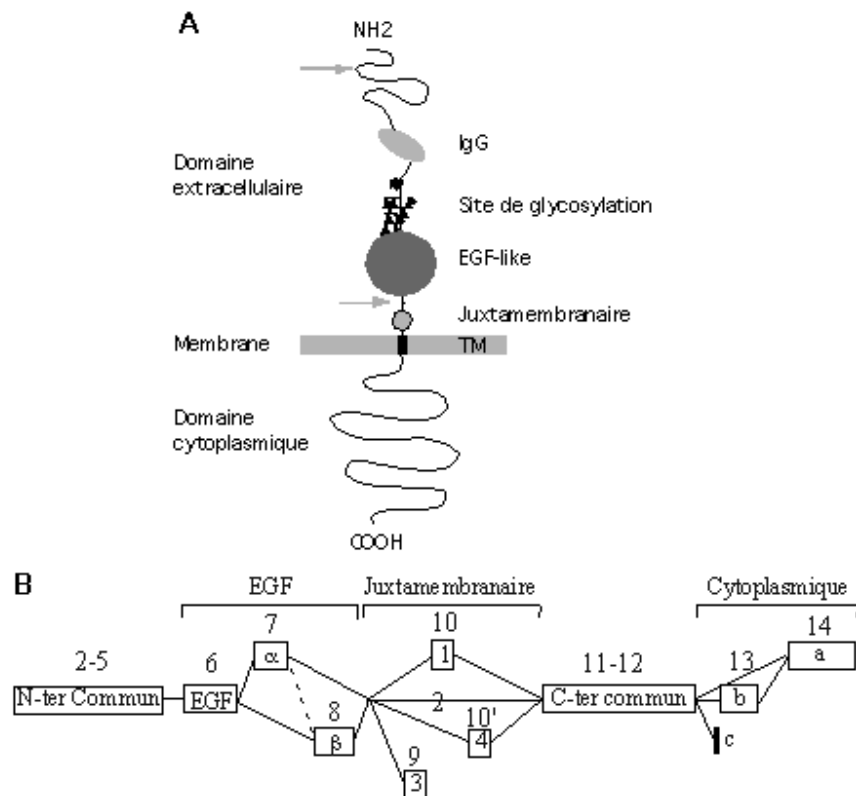


Figure I.12. : A : L'HRG est une protéine synthétisée, comme les autres membres de la famille de l'EGF, sous forme d'un précurseur transmembranaire. B : Parmi les différents domaines de la protéine précurseur de l'HRG, trois domaines montrent une séquence variable résultant du splicing alternatif d'un gène unique. Les chiffres au dessus des encadrés représentant les différents domaines correspondent aux exons potentiels décrits par Marchionni *et al.* (1993). Le domaine EGF-like diverge dans sa séquence C-term et définit les isoformes α et β responsables de l'affinité de liaison du facteur soluble pour son récepteur. Le domaine juxtamembranaire existe sous quatre formes différentes. La plus courte, l'isoforme 2, ne possède pas de séquence spécifique. Les isoformes 1, 3 et 4 possèdent une séquence spécifique résultant de l'utilisation, respectivement, de l'exon 10, 9 ou 10'. L'isoforme 3 est cependant particulière puisque sa séquence spécifique se termine par un codon stop précoce induisant la formation d'une protéine plus courte sans domaine transmembranaire. Finalement, le domaine cytoplasmique existe sous trois formes différentes. La région N-term, commune aux trois isoformes, se poursuit soit directement par l'exon 14 et définit l'isoforme a, soit par l'exon 13 et 14 pour l'isoforme b, soit par un exon débutant par un codon stop pour l'isoforme c. L'isoforme c ne possède donc pas de séquence spécifique tandis que l'isoforme b possède une séquence identique à l'isoforme a additionnée d'une séquence propre interne.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| <u>INTRODUCTION</u> | 4 |
| 1. La peau | 5 |
| 1.1. L'épiderme | 5 |
| 1.1.1 L'épiderme s'organise en quatre couches cellulaires | 6 |
| 1.1.1.1. La couche basale (Stratum Basal) | 6 |
| 1.1.1.2. La couche épineuse (Stratum Spinosum) | 6 |
| 1.1.1.3. La couche granuleuse (Stratum Granulosum) | 7 |
| 1.1.1.4. La couche cornée (Stratum Corneum) | 7 |
| 1.2. La jonction épidermo-dermique (JED) | 7 |
| 2. Le kératinocyte épidermique | 8 |
| 2.1. La prolifération et la différenciation du kératinocyte se caractérisent par l'expression de certains gènes | 8 |
| 2.2. La prolifération et la différenciation du kératinocyte sont régulés par de multiples facteurs environnementaux | 9 |
| 2.3. Les modèles de culture des kératinocytes épidermiques humains | 11 |
| 2.3.1. Kératinocytes en cultures adhérentes | 11 |
| 2.3.2. Kératinocytes en culture en suspension | 12 |
| 3. Rôle de l'ancrage à la matrice extracellulaire sur la différenciation épidermique | 12 |
| 3.1. L'adhésion à la matrice extracellulaire | 12 |
| 3.1.1. Les intégrines | 12 |
| 3.1.1.1. La structure et la composition | 12 |
| 3.1.1.2. Localisation des intégrines épidermiques | 13 |
| 3.1.1.3. Les classes principales d'intégrines épidermiques impliquées dans l'adhésion à la matrice extracellulaire | 13 |
| A. Les intégrines à sous-unité β_1 | 13 |
| B. Les intégrines à sous-unité β_4 | 13 |
| 3.1.1.4. Les ligands liés par les intégrines | 14 |
| 3.1.1.5. La fixation du ligand sur l'intégrine peut dépendre de la présence d'une séquence particulière appelée séquence RGD | 14 |
| 3.1.1.6. Les intégrines transmettent des signaux de l'environnement extracellulaire vers l'environnement intracellulaire | 14 |
| 3.1.1.7. Les contacts focaux et hémidesmosomes | 14 |
| A. Le contact focal | 15 |
| B. Les hémidesmosomes | 15 |
| 3.1.2. La perte d'ancrage du kératinocyte épidermique induit sa différenciation terminale | 15 |
| 3.2. L'adhésion intercellulaire | 16 |
| 3.2.1. Les cadhérines | 16 |
| 3.2.2. Les jonctions « adherens » | 17 |
| 3.2.3. Les desmosomes | 17 |
| 4. Rôle des facteurs de croissance de la superfamille de l'EGF sur la différenciation épidermique | 17 |
| 4.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille des HER | 18 |
| 4.1.1. Le récepteur de l'EGF (EGFR)/c-erbB-1/HER1 | 19 |
| 4.1.2. Le récepteur neu/c-erbB-2/HER2 | 19 |
| 4.1.3. Le récepteur c-erbB-3/HER3 | 19 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1.4. Le récepteur c-erbB-4/HER4 | 20 |
| 4.2. Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF | 20 |
| 4.3. Les facteurs de croissance de la famille de l'HRG | 21 |
| 4.4. Effet des facteurs de croissance de la superfamille de l'EGF sur l'expression des marqueurs de différenciation des kératinocytes épidermiques..... | 22 |
| 5. Objectif | 23 |
| <u>MATERIEL ET METHODES</u> | 24 |
| 1. Culture des kératinocytes épidermiques humains | 25 |
| 1.1. Matériel | 25 |
| 1.2. Méthode | 25 |
| 1.2.1. Etablissement des cultures primaires de kératinocytes à partir des prélèvements cutanés | 25 |
| 1.2.2. Etablissement des cultures secondaires et tertiaires de kératinocytes | 26 |
| 1.2.3. Etablissement des cultures en suspension | 26 |
| 2. Analyse des transcrits | 27 |
| 2.1. Isolement des ARNm poly(A) | 27 |
| 2.1.1. Matériel | 27 |
| 2.1.2. Méthode | 27 |
| 2.2. Northern blot | 28 |
| 2.2.1. Matériel | 28 |
| 2.2.2. Méthode | 29 |
| 2.3. Hybridation des Northern blots par sondes ADN marquées au ³² P | 29 |
| 2.3.1. Matériel | 29 |
| 2.3.2. Méthode | 29 |
| 2.3.2.1. Préparation des membranes | 29 |
| 2.3.2.2. Préparation des sondes marquées au ³² P et hybridation des membranes | 30 |
| 2.3.2.3. Lavages des membranes | 30 |
| 2.3.2.4. Révélation des membranes | 30 |
| 2.4. RT-PCR de la profilaggrine | 31 |
| 2.4.1. Matériel | 31 |
| 2.4.2. Méthode | 31 |
| 3. Analyse des protéines | 32 |
| 3.1. Marquage en immunofluorescence | 32 |
| 3.1.1. Matériel | 32 |
| 3.1.2. Méthode | 32 |
| 3.2. Western blot | 33 |
| 3.2.1. Matériel | 33 |
| 3.2.2. Méthode | 33 |
| <u>RESULTATS ET DISCUSSION</u> | 35 |
| 1. Analyse des cultures autonomes adhérentes de kératinocytes épidermiques humains en présence ou non de facteurs de croissance (EGF, HRGα ou HRGβ) | 36 |
| 2. La mise en suspension des kératinocytes épidermiques humains favorise leur différenciation cellulaire | 39 |
| 3. Effet des facteurs de croissance de la famille de l'EGF et de l'HRG sur la différenciation induite par la mise en suspension pendant 24 heures des kératinocytes | |

| | |
|---|-----------|
| épidermiques humains..... | 42 |
| 3.1. L'EGF favorise la différenciation épidermique amorcée par la mise en suspension pendant 24 heures | 42 |
| 3.2. L'HRG n'affecte pas la différenciation épidermique induite par la mise en suspension 24 heures | 45 |
| 4. Analyse de l'expression des récepteurs de la famille des HER | 46 |
| 4.1. Effet de la mise en suspension 24 heures sur l'expression des récepteurs de la famille des HER | 46 |
| 4.2. Effet de l'EGF sur l'expression des récepteurs de la famille des HER | 47 |
| 4.3. Effet de l'HRG sur l'expression des récepteurs de la famille des HER | 48 |
| 5. Analyse de l'activation des récepteurs HER1 et HER2 | 48 |
| 5.1. Le récepteur HER1 | 49 |
| 5.2. Le récepteur HER2 | 49 |
| 5.2.1. La mise en suspension 24 heures favorise l'activation du récepteur HER2..... | 49 |
| 5.2.2. L'EGF est un activateur puissant du récepteur HER2 | 50 |
| 5.2.3. L'HRG n'active pas le récepteur HER2 | 50 |
| 6. Localisation des récepteurs HER1 et HER2 | 50 |
| 7. Effet de la mise en suspension 48 heures des kératinocytes épidermiques humains sur leur différenciation..... | 51 |
| <u>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</u> | 54 |
| <u>BIBLIOGRAPHIE</u> | 58 |

INTRODUCTION

1. La peau

Tous les organismes sont continuellement confrontés à de multiples agressions environnementales de diverses origines et notamment mécanique, chimique, thermique et autres. La peau, organe complexe et constitué de plusieurs couches, représente la première ligne de défense contre ces agressions, mais elle est aussi le siège des échanges de l'organisme avec son environnement et se trouve donc pourvue à cet effet de diverses structures telles que les annexes et glandes cutanées, ainsi qu'un réseau de neurorécepteurs et autres terminaisons nerveuses.

La peau d'un individu moyen adulte couvre en moyenne une surface de 1,7 m² et présente des variations notamment dans son épaisseur, sa composition et sa densité en appendices, selon les besoins fonctionnels locaux. Trois couches de la peau sont à distinguer : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (figure I.1.).

L'épiderme, la couche la plus externe de la peau, présente généralement une épaisseur variant de 75 µm à 150 µm en dehors des régions plantaires et palmaires où il est plus épais. L'épiderme comprend une variété de types cellulaires spécialisés. Cependant, le type cellulaire majeur et responsable de la formation de la barrière cornée protectrice de l'épiderme est le kératinocyte. Le kératinocyte épidermique procure cette barrière à la peau en se soumettant à un programme de différenciation complexe.

Le derme, localisé sous l'épiderme, se compose de tissu conjonctif riche en fibres de collagène (assurant un rôle de résistance face à des forces de traction), en fibres d'élastine (assurant un rôle de souplesse), en fibroblastes et en substance fondamentale (assurant un rôle de résistance face à des forces de compression). Le derme héberge aussi diverses annexes cutanées épithéliales (ongles, poils, glandes sudoripares et sébacées). Richement vascularisé, le derme permet notamment de nourrir l'épiderme par diffusion des nutriments à partir des capillaires sanguins.

Sous le derme, l'hypoderme est un tissu conjonctif pauvre en fibres et est composé essentiellement de lobules adipeux.

Dans ce travail, nous nous sommes essentiellement intéressés à l'épiderme, et plus particulièrement au type cellulaire principal de ce tissu, le kératinocyte épidermique.

1.1. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié et kératinisé, situé à l'interface entre l'organisme et son environnement. Sur la majorité du corps, on retrouve un épiderme mince (de type B) présentant une desquamation assez rapide et donc une couche cornée assez fine. Sur la paume des mains et la plante des pieds, l'épithélium présente une couche cornée beaucoup plus épaisse caractéristique d'un épiderme de type A assurant une meilleure résistance. Pour notre étude, les kératinocytes proviendront d'un épiderme de type B.

L'épiderme est constitué de plusieurs types cellulaires dont le kératinocyte qui représente la grande majorité des cellules épidermiques. Le rôle du kératinocyte est crucial pour le renouvellement de l'épiderme, mais aussi pour établir son rôle de protection contre les agressions externes. En effet, le maintien de la population cellulaire de l'épiderme dépend

d'une régulation entre la production (prolifération) et la perte (différenciation/apoptose/desquamation) des kératinocytes. Cette régulation est assurée par des mécanismes complexes faisant intervenir de nombreux facteurs environnementaux.

D'autres types cellulaires nettement moins abondants font également partie de l'épiderme. Ce sont les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merckel (types cellulaires qui seront absents de nos cultures).

- Les mélanocytes représentent la deuxième population cellulaire de l'épiderme et sont responsables de la synthèse de mélanine stockée dans les organites spécialisés, les mélanosomes. Après maturation, les mélanosomes sont transférés vers les kératinocytes.

- Les cellules de Langerhans représentent la troisième population cellulaire de l'épiderme et résident dans les couches suprabasales. Ce sont des cellules dendritiques localisées entre les kératinocytes et qui participent à la mise en place de la réaction immunitaire cellulaire, notamment par la présentation d'antigènes.

- Les cellules de Merckel représentent la quatrième population cellulaire de l'épiderme, sont situés dans la couche basale et fonctionnent comme des mécanorécepteurs au contact des terminaisons nerveuses.

1.1.1. L'épiderme s'organise en quatre couches cellulaires

Au sein de l'épiderme, les kératinocytes en différenciation forment différentes couches cellulaires (basale, épineuse, granuleuse et cornée) caractérisées par la morphologie, la composition biochimique et l'état de différenciation des cellules (figure I.2.).

1.1.1.1. La couche basale (Stratum Basal)

La couche basale consiste en une couche unique formée des kératinocytes cylindriques ancrés sur la lame basale par l'intermédiaire des hémidesmosomes et attachés les uns aux autres par des desmosomes (figure I.3). Malgré une homogénéité morphologique des kératinocytes, la couche basale présente des cellules avec une hétérogénéité fonctionnelle. En effet, trois catégories de kératinocytes peuvent y être identifiés sur base de leur clonogénicité. Les cellules souches, au potentiel de division lent mais illimité, sont responsables du renouvellement continu de l'épiderme au cours de la vie. Ces cellules souches donnent naissance aux cellules intermédiaires amplificatrices, dont le nombre de divisions rapides est limité. Les cellules post-mitotiques, provenant de la division d'une cellule amplificatrice, quittent la couche basale et amorcent le processus de différenciation épidermique dès la perte d'adhésion à la matrice extracellulaire. Sans hémidesmosomes, ces cellules migrent pour constituer les différentes couches suprabasales de l'épiderme.

1.1.1.2. La couche épineuse (Stratum Spinosum)

La deuxième couche de l'épiderme, la couche épineuse, est située immédiatement au-dessus de la couche basale. Cette couche épineuse est épaisse d'environ 3 ou 4 cellules qui s'aplatissent au fur et à mesure de leur ascension dans le tissu. A ce stade, le noyau et les organites cellulaires sont intacts et les filaments intermédiaires de kératine se regroupent en faisceaux denses. Cette couche est caractérisée d'une part par la présence d'un grand nombre de desmosomes et de beaucoup de filaments intermédiaires de kératine assurant une

connexion entre les cellules et étant responsables de la morphologie en épine des cellules, et d'autre part par l'apparition de nouveaux organites multilamellaires, les corps d'Odland. Ces organites, d'origine golgienne, sont des structures bordées d'une membrane et contenant une série de bicouches lipidiques disposées en lamelles.

1.1.1.3. La couche granuleuse (Stratum Granulosum)

Suivant la couche épineuse, la couche granuleuse est épaisse de 2 à 3 kératinocytes aplatis montrant une pycnose de leur noyau. Cette couche se caractérise par la présence de granules basophiles de kératohyaline, composés principalement d'une protéine phosphorylée riche en histidine, la profilaggrine. La forme monomérique mature, la filaggrine, est obtenue par déphosphorylation de la forme précurseur multimérique, la profilaggrine. Cette conversion se réalise lors de la transition d'une cellule granuleuse en une cellule cornée. C'est au niveau de la jonction entre la couche granuleuse et la couche cornée que les corps d'Odland fusionnent avec la membrane plasmique et déversent leur contenu dans l'espace intercellulaire pour constituer le « ciment » intercellulaire. Récemment, des jonctions serrées ou « tight » ont été localisées entre les kératinocytes de la couche granuleuse.

1.1.1.4. La couche cornée (Stratum Corneum)

La couche cornée fournit la barrière de protection majeure de la peau. Elle est composée de plusieurs couches de kératinocytes non vivants en fin de différenciation terminale. L'épaisseur de la couche cornée est très variable. A ce niveau, les kératinocytes sont aplatis, sans noyau ni organite et sont attachés les uns aux autres par le « ciment » intercellulaire constitué par les lipides provenant des corps d'Odland. Le contenu cellulaire se modifie également : la filaggrine, résultant de la déphosphorylation de la profilaggrine, est responsable du passage de l'organisation en faisceaux vers l'organisation en réseau dense des filaments intermédiaires. La filaggrine catalyse la formation de ponts disulfures entre ces filaments intermédiaires, puis elle est ensuite protéolysée en peptides et acides aminés libres jouant un rôle dans l'hydratation des couches superficielles. La membrane des kératinocytes de la couche cornée se modifie aussi par la polymérisation de l'enveloppe cornée : en effet, sous l'action de la transglutaminase 1 (TGase1), les protéines telles que la loricrine, les « small proline-rich proteins » (SPRs) et l'involucrine synthétisées par les cellules des couches épineuses et granuleuses se conjuguent les unes aux autres. Au fur et à mesure que les kératinocytes atteignent la surface de la couche cornée, ils perdent leurs attaches par dégradation protéolytique des desmosomes, ce qui va permettre leur desquamation.

1.2. La jonction épidermo-dermique (JED)

La jonction épidermo-dermique (JED) ou lame basale épidermique constitue le site d'ancrage de l'épiderme au derme sous-jacent et influence de ce fait le comportement des kératinocytes en modulant la polarité, la prolifération, la migration et la différenciation des cellules (figure I.4.). Cette structure est surtout élaborée par les kératinocytes épidermiques de la couche basale mais les fibroblastes du derme y contribuent (McKee, 1996; Holbrook et Smith, 1993). Cette jonction épidermo-dermique s'organise en quatre régions distinctes allant de l'épiderme au derme (McKee, 1996) : - le pôle basal des kératinocytes contenant les hémidesmosomes dans lesquels les filaments de kératine viennent s'ancrer.

- la lamina lucida est une région claire aux électrons et traversée par les filaments d'ancrage connectant les hémidesmosomes à la lamina densa via sa liaison notamment à l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$.

- la lamina densa est une région dense aux électrons dans laquelle viennent s'accrocher les filaments d'ancrage.

- la sub-lamina densa est une région située immédiatement sous la lamina densa et contient les fibrilles d'ancrage constituées essentiellement de collagène de type VII, reliant la lamina densa aux plaques d'ancrage (zones denses aux électrons et constituées de collagène de type VII) du derme superficiel.

Les complexes d'ancrage des kératinocytes sont composés de molécules qui attachent les cellules épidermiques à la matrice extracellulaire dermique via la jonction épidermo-dermique et qui s'associent en deux structures : les hémidesmosomes et les contacts focaux. Ces deux types de structure seront détaillées dans le chapitre concernant le rôle de l'ancrage à la matrice extracellulaire sur la différenciation épidermiques (cf. paragraphe 3.1.7.).

2. Le kératinocyte épidermique

Après avoir décrit l'épiderme en tant que tissu, nous allons nous focaliser sur sa cellule principale et notamment sur les facteurs environnementaux qui régulent son phénotype.

2.1. La prolifération et la différenciation du kératinocyte se caractérisent par l'expression de certains gènes

L'épiderme se scinde en deux compartiments : un compartiment de prolifération et un compartiment de différenciation. Le compartiment de prolifération ou compartiment germinatif se caractérise par la présence de cellules en division, ancrées sur une lame basale épidermique constituant le site d'ancrage de l'épiderme au derme sous-jacent. Dès la perte d'adhésion à la lame basale épidermique (jonction épidermo-dermique), le kératinocyte subit des modifications phénotypiques caractérisant le processus de différenciation. Ces modifications permettent de distinguer les cellules non différenciées, des cellules en différenciation précoce et des cellules en différenciation tardive.

Les kératines, la filaggrine et les protéines précurseurs de l'enveloppe cornée, notamment la loricrine, l'involucrine et la transglutaminase 1 constituent de véritables marqueurs pour l'étude de la différenciation des kératinocytes en culture.

Les kératines, au nombre de 20 chez l'homme, sont des protéines fibreuses formées d'hélices α et classées en protéines acides (kératines de type I) et basiques (kératine de type II). Leur nombreux ponts disulfures permettent la cohésion entre une kératine acide et une kératine basique. L'unité de base des filaments intermédiaires, le protofilament de 3 nm de diamètre, est formé par l'association de 4 sous-unités polypeptidiques enroulées en hélice. L'assemblage de 8 protofilaments forment le filament de 10 nm de diamètre (figure I.5.). Une sous-unité de kératine comporte un domaine central hélicoïdal d'environ 300 acides aminés. Ce domaine central est bordé par 2 domaines à savoir 1 domaine amino-terminal et 1 domaine carboxy-terminal variant en séquence et en taille selon la kératine. En effet, les kératines basiques possèdent des domaines amino- et carboxy-terminaux de taille plus importante que pour les kératines acides. Les tonofilaments sont attachés aux desmosomes et

hémidesmosomes et assurent la cohésion intercellulaire ainsi que l'adhésion à leur matrice extracellulaire de la jonction épidermo-dermique.

La classification de Moll (Moll et al., 1982) détermine un profil de dispersion des différentes kératines dont l'expression varie de façon quantitative et qualitative selon la localisation anatomique de l'épiderme et selon l'état de différenciation des kératinocytes. Les kératines 5 et 14 sont principalement exprimées par les cellules de la couche basale et constituent donc des marqueurs de cellules non différenciées, alors que les kératines 1 et 10 sont exprimées plutôt dans les couches suprabasales et constituent alors des marqueurs de cellules en différenciation précoces (Poumay et Pittelkow, 1995). De plus, dans le cas de psoriasis ou de blessure, les kératines 6 et 16 sont exprimées dans l'épiderme hyperprolifératif.

Les différentes kératines épidermiques représentent une famille de protéines d'origine multigénique (les kératines acides sont codées par des gènes du chromosome 12 tandis que les kératines basiques sont codées par des gènes du chromosome 17) et leur expression est contrôlée au niveau transcriptionnel.

L'apparition de protéines impliquées dans la formation de l'enveloppe cornée est un marqueur de différenciation tardive. Parmi ces protéines, nous pouvons citer la loricrine et l'involucrine, exprimées principalement par les cellules de la couche granuleuse. Une autre protéine typique de cette couche, la filaggrine (37 kDa) est obtenue par déphosphorylation de la profilaggrine (300 kDa) et catalyse la formation de ponts disulfure entre les filaments intermédiaires dans la couche cornée. De plus, après protéolyse de la filaggrine dans les couches superficielles de la couche cornée, les peptides et acides aminés obtenus jouent un rôle important dans l'hydratation de la couche cornée.

Par une action de la transglutaminase1 activée par une entrée massive de calcium, l'involucrine, la loricrine et les « small proline-rich proteins » (SPRs) se conjuguent les unes aux autres pour former l'enveloppe cornée.

2.2. La prolifération et la différenciation du kératinocyte sont régulées par de multiples facteurs environnementaux

L'épiderme est un tissu dynamique dont l'homéostasie est maintenue grâce à un équilibre entre la prolifération des kératinocytes de la couche basale et la desquamation des kératinocytes de la couche cornée. Cet équilibre implique un contrôle du taux de prolifération, ainsi qu'un contrôle de la différenciation permettant la formation des cellules cornées ainsi que la mise en place des mécanismes responsables de la desquamation.

La prolifération dans l'épiderme dépend de la nature des cellules en division, mais aussi des signaux externes auxquelles les cellules répondent.

- Les facteurs de croissance « insulin-like » (IGF-I et IGF-II) favorisent la prolifération du kératinocyte. Ces facteurs sont d'importants régulateurs de la croissance épidermique et sont considérés comme essentiels pour une fonction épidermique normale. Les facteurs « insulin-like » stimulent d'une part la prolifération et d'autre part la migration du kératinocyte (Ando et al., 1993). Le traitement des kératinocytes avec l'IGF-I augmente par exemple l'expression des récepteurs à l'EGF (EGFR) de 2 à 4 fois (Krane et al., 1991).

- Le facteur de croissance épidermique (EGF) favorise à la fois la prolifération et la migration du kératinocyte (Chen et al., 1993) tout comme le polypeptide qui lui est apparenté, le Transforming Growth Factor α (TGF α). D'autres facteurs de croissance comme l'amphiréguline se lient au même récepteur et régulent aussi la prolifération du kératinocyte (Pittelkow et al., 1993). En cas de psoriasis, les récepteurs de l'EGF et ses ligands sont en nombre très élevé. Le traitement avec différents agents réduisant la synthèse de TGF α et l'expression des récepteurs de l'EGF, suggère un rôle de ces récepteurs dans l'étiologie du psoriasis (Elder, 1994).

- Le facteur de croissance du kératinocyte (KGF) est sécrété par les fibroblastes provenant des tissus épithéliaux (Aaronson et al., 1990) et constitue un facteur stimulant la prolifération des cellules épithéliales. Le KGF est un membre de la famille des facteurs de croissance du fibroblaste (FGF-7) et est aussi actif que l'EGF pour stimuler la prolifération des kératinocytes épidermiques en culture (Marchese et al., 1990). Cependant, le KGF diffère de l'EGF par sa capacité à stimuler la différenciation cellulaire (Marchese et al., 1990).

- Par contre, le Transforming Growth Factor β (TGF β) est connu pour inhiber la prolifération des kératinocytes et pour induire leur différenciation (Shipley et al., 1986).

- Une autre classe de régulateurs est constituée par les rétinoïdes (vitamine A) qui diminuent l'induction de la différenciation terminale à la fois *in vivo* et *in vitro* (Poumay et al., 1999).

- La concentration extracellulaire en calcium joue un rôle important dans le contrôle de la prolifération et la différenciation du kératinocyte. En effet, un gradient de calcium est présent au sein de l'épiderme avec une concentration en calcium assez faible dans la couche basale et une concentration en calcium plus élevée dans les couches suprabasales (Menon et al., 1985) et suggère ainsi un rôle pour le calcium dans cette régulation. Une concentration faible en calcium (0,05-0,1 mM) empêche la formation des desmosomes et autres jonctions intercellulaires (Hennings et al., 1980), ce qui retarde la différenciation (Yuspa et al., 1981; Tsao et al., 1982). Une concentration plus élevée en calcium (1 mM) favorise l'établissement des jonctions intercellulaires et la différenciation (Hines et al., 1999).

- La perte d'adhésion des kératinocytes à la matrice extracellulaire constitue un événement qui va favoriser leur différenciation en rejoignant les couches suprabasales (Watt, 2002). La modulation de cette adhésion permet de souligner l'importance du rôle joué par les molécules d'adhésion de la famille des intégrines (Watt, 2002).

- L'atteinte de la confluence par les kératinocytes épidermiques cultivés en faible concentration en calcium implique le début de leur différenciation (Poumay et Pittelkow., 1995): la perte de la clonogénicité des cellules et l'expression des marqueurs de différenciation précoces (kératines 1 et 10) caractérisent cette induction de la différenciation qui est probablement aussi liée à la stabilisation cellulaire et donc à la perte d'ancrage sur la matrice extracellulaire.

On peut donc en conclure que la régulation de la prolifération et de la différenciation du kératinocyte est complexe et implique plusieurs facteurs environnementaux.

2.3. Les modèles de culture des kératinocytes épidermiques humains

2.3.1. Kératinocytes en cultures adhérentes

Rheinwald et Green en 1975 ont mis au point une première technique permettant de multiplier *in vitro* les kératinocytes épidermiques humains. Elle implique d'une part l'utilisation d'un milieu supplémenté en sérum de veau fœtal, en facteurs de croissance tels que l'insuline et l'EGF, en toxine cholérique et d'autre part, sur la mise en place d'une couche nourricière de fibroblastes irradiés mais toujours capables de synthétiser divers facteurs non définis qui favorisent l'attachement des kératinocytes et leur prolifération. Les cellules épidermiques prolifèrent en formant des colonies qui s'étendent de plus en plus et repoussent les cellules nourricières en périphérie. Cette méthode de culture est optimale pour générer rapidement la croissance des cellules et obtenir ainsi des feuillets de kératinocytes utilisés notamment dans les greffes de grands brûlés. Cependant, dans ce modèle de culture, les variations biochimiques caractéristiques de la différenciation du kératinocyte, telles que l'expression des kératines 1 et 10, ne sont pas induites. Associé à l'impossibilité de contrôler totalement la composition exacte du milieu tout au long de la culture, cette technique ne permet pas d'étudier l'effet de facteurs précis (facteurs de croissance, notamment) sur la régulation de la prolifération et la différenciation des kératinocytes épidermiques.

Suite à cette problématique, Boyce et Ham (1983) ont présenté un milieu de culture sans sérum : le milieu MCDB 153, permettant la croissance des kératinocytes en absence d'une couche nourricière de fibroblastes. Le milieu est cependant supplémenté d'EGF, d'insuline, d'hydrocortisone, d'éthanolamine et de phosphoéthanolamine, ainsi qu'une faible quantité d'extrait pituitaire bovin (BPE) pour permettre d'initier les cultures primaires. Boyce et Ham (1983) ont démontré que le taux de croissance des kératinocytes, dans leur système de culture, augmentait lorsque les concentrations en calcium extracellulaires se trouvent entre 0,03 et 0,3 mM et qu'il est même maximum à 0,1 mM. Cependant, lorsque la concentration en calcium est de 1,0 mM, le taux de croissance des cellules diminue et la différenciation terminale est induite.

Plus tard, Cook et al. (1991a) ont démontré que les facteurs peptidiques mitogènes exogènes tels que l'EGF et l'insuline, ainsi que les facteurs contenus dans le BPE, ne sont indispensables que pour l'initiation de la croissance des kératinocytes à des densités clonales en culture et que la prolifération à des densités supérieures à 10^3 cellules/cm² se déroule en l'absence de ces facteurs. Dès que les cellules atteignent une densité suffisante (lorsqu'elle recouvrent pratiquement 40-50% de la superficie de la culture), elles acquièrent une autonomie de croissance, notamment par la synthèse endogène d'un facteur qui stimule leur prolifération : l'amphiréguline (AR) (Cook et al., 1991b). Pittelkow et al. (1993) ont d'ailleurs analysé l'importance de ce facteur de croissance en démontrant la nécessité pour son récepteur (récepteur de l'EGF) d'être occupé par un ligand pour permettre la croissance autocrine des kératinocytes. De plus, le passage en culture autocrine permet non seulement de contrôler la composition du milieu, mais présente également l'avantage de permettre aux kératinocytes de suivre un processus de différenciation comparable à celui mis en place par les cellules *in vivo* (Poumay et Pittelkow, 1995).

2.3.2. Kératinocytes en culture en suspension

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'épiderme est un tissu épithélial constitué de plusieurs couches et dont l'homéostasie est maintenue par une régulation précise entre la prolifération et la différenciation, aboutissant à la mort des kératinocytes et à leur desquamation en surface du tissu. La croissance cellulaire est limitée à la couche basale reposant sur la jonction épidermo-dermique. Lorsque des kératinocytes quittent cette couche basale pour rejoindre les couches suprabasales, ils cessent de proliférer et amorcent leur processus de différenciation. Afin de maintenir des kératinocytes sans adhésion à leur matrice extracellulaire, la culture en suspension a été utilisée d'après la méthode de Frisch et Francis (1994). Cette méthode utilise une molécule particulière, le polyhydroxyéthylméthacrylate (poly-HEMA), lequel empêche les cellules d'adhérer au plastique des boîtes de culture sans interférer avec les interactions intercellulaires (figure I.6.). Dans notre travail, les kératinocytes épidermiques humains ont été cultivés en suspension dans du milieu de culture autocrine. Comme pour les cellules en culture adhérente, ce milieu permet le contrôle de sa composition et n'empêche pas un processus de différenciation analogue à celui suivi par les cellules *in vivo* (Poumay et Pittelkow, 1995). Dans ce modèle, les kératinocytes sur poly-HEMA n'établissent pas d'ancrage à la matrice extracellulaire, mais interagissent éventuellement entre eux. Remarquons cependant, que l'utilisation d'un milieu de culture contenant une concentration en calcium faible (0,06 mM) ne permet pas l'établissement des interactions intercellulaires utilisant les molécules d'adhésion de type cadhérine (Hines et al., 1999). Il n'y aura donc pas dans ce modèle des jonctions de type adhérents ou desmosomes (Boyce et Ham, 1983). Un autre type de modèle de suspension a été utilisé par Adams et Watt (1989) et consiste à resuspendre des kératinocytes dans un milieu supplémenté de méthylcellulose, empêchant ainsi les kératinocytes d'adhérer à leur substrat.

3. Rôle de l'ancrage à la matrice extracellulaire sur la différenciation épidermique

3.1. L'adhésion à la matrice extracellulaire

Certains éléments de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la laminine, le collagène et les protéoglycanes sont capables de s'unir à des molécules d'adhésion transmembranaires situées à la surface des cellules. Les molécules les plus importantes pour attacher les cellules à leur environnement extracellulaire sont les intégrines.

3.1.1. Les intégrines

3.1.1.1. La structure et la composition

Les intégrines constituent une superfamille de protéines transmembranaires composées de deux chaînes polypeptidiques, une chaîne α et une chaîne β , réunies par liaisons non covalentes (figure I.7.). La plupart des intégrines sont exprimées sur une large variété de cellules et la plupart des cellules expriment plusieurs types d'intégrines. Les intégrines exprimées par les kératinocytes peuvent être classées en différentes catégories, selon qu'elles sont exprimées de façon abondante ou non, ou selon qu'elles sont exprimées de façon constitutive ou induites en cas de blessure ou en cas de conditions pathologiques. Les deux sous-unités d'intégrine α et β ont une grande portion extracellulaire qui porte les sites de liaison aux ligands de la matrice extracellulaire, un court segment transmembranaire unique et

un petit domaine cytoplasmique (long de 40 à 80 acides aminés), à l'exception de la chaîne β_4 qui possède une chaîne cytoplasmique beaucoup plus longue lui permettant de s'étendre plus profondément dans le cytoplasme. Le domaine cytoplasmique contient des sites de liaison à des éléments du cytosquelette. Les intégrines peuvent donc s'unir à des substances situées des deux côtés de la membrane plasmique, ce qui implique que ces protéines sont capables de transmettre des signaux entre les compartiments extra- et intracellulaire. Toutes les sous-unités β sont caractérisées par une répétition en quatre exemplaires d'un segment riche en cystéine. L'extrémité N-terminale est repliée avec des boucles internes liées par ponts disulfures et fait partie du domaine de fixation au ligand (Hynes, 1992). Les sous-unités α contiennent toutes un segment homologue répété sept fois et dont les trois à quatre dernières séquences répétées constituent un site de liaison au calcium.

3.1.1.2. Localisation des intégrines épidermiques

Dans un épiderme normal, non endommagé, l'expression des intégrines se confine à la couche basale. L'intégrine $\alpha_6\beta_4$ se concentre au niveau de la membrane basale épidermique et est un composant des hémidesmosomes. Les autres intégrines se distribuent sur les surfaces basale, latérales et apicale des kératinocytes basaux (Watt et Hertle, 1994).

Par contre, l'expression des intégrines est perturbée dans deux situations distinctes. La première se caractérise par l'expression des intégrines dans les couches suprabasales, laquelle est généralement associée à une hyperprolifération par exemple au cours du processus de cicatrisation épidermique, dans les lésions psoriatiques, mais aussi dans des tumeurs (carcinome) (Watt et Hertle, 1994). La deuxième se caractérise par la perte des intégrines survenant également dans certaines tumeurs (Jones et al., 1993) et semblerait jouer un rôle dans l'invasion des tissus (Downer et al., 1993).

3.1.1.3. Les classes principales d'intégrines épidermiques impliquées dans l'adhésion à la matrice extracellulaire

A. Les intégrines à sous-unité β_1

De nombreuses intégrines à sous-unité β_1 sont exprimées par les kératinocytes épidermiques comme les intégrines $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_9\beta_1$. Ces intégrines à sous-unité β_1 sont principalement impliquées dans l'adhésion des cellules à leur matrice extracellulaire. Les intégrines $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_3\beta_1$ sont exprimées de façon constitutive par les kératinocytes, tandis que l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est faiblement exprimée par les kératinocytes en culture, en cas de blessure, et en conditions pathologiques. La distribution des intégrines de type β_1 est restreinte à la couche basale de l'épiderme au niveau des contacts focaux mais aussi sur toute la périphérie de ces cellules basales (Braga et al., 1998).

B. Les intégrines à sous-unité β_4

La sous-unité d'intégrine β_4 ne s'associe qu'avec la sous-unité α_6 pour former un hétérodimère se localisant au pôle basal des kératinocytes épidermiques basaux et qui devient un constituant des hémidesmosomes. Cette intégrine est exprimée de façon constitutive par ces kératinocytes basaux. La laminine 5 constitue le ligand majeur de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$. De par sa localisation, l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ joue un rôle crucial dans l'adhésion des kératinocytes épidermiques à leur matrice extracellulaire.

Nous reviendrons plus tard dans ce chapitre sur l'importance de ces deux types d'intégrines dans l'ancrage à la matrice extracellulaire.

3.1.1.4. Les ligands liés par les intégrines

Les intégrines ($\alpha_2\beta_1$) peuvent lier plusieurs types de ligand et le même ligand peut être lié par plusieurs intégrines (fibronectine). Certaines intégrines comme $\alpha_1\beta_1$ $\alpha_5\beta_1$ $\alpha_6\beta_4$ sont impliquées principalement dans les interactions avec la matrice extracellulaire faisant intervenir notamment le collagène, la laminine, la fibronectine et les protéoglycanes. D'autres intégrines comme par exemple $\alpha_L\beta_2$ sont impliquées dans le mécanisme de diapédèse survenant au cours d'une inflammation tissulaire et interagissent avec des protéines de la superfamille des immunoglobulines, comme ICAM-1. D'autres intégrines encore et notamment $\alpha_{IIb}\beta_3$ participent à l'agrégation des plaquettes et donc à la formation d'un caillot sanguin dans un vaisseau. Ces deux dernières classes d'intégrines interviennent donc dans l'adhésion intercellulaire.

3.1.1.5. La fixation du ligand sur l'intégrine peut dépendre de la présence d'une séquence particulière appelée séquence RGD

La plupart des protéines extracellulaires qui se lient aux intégrines le font parce qu'elles contiennent une séquence d'acides aminés arginine-glycine-acide aspartique (RGD). Cette séquence tripeptidique existe notamment dans les sites de liaison de la fibronectine, de la laminine et du collagène. Le motif RGD est généralement localisé au sommet d'une boucle formée par la conformation de la protéine et s'étend vers l'extérieur de la protéine. La conformation de la protéine et de la séquence RGD va cependant influencer l'affinité mais aussi la reconnaissance du ligand. En effet, la séquence RGD doit adopter une conformation adéquate pour permettre sa fixation aux intégrines et la séquence RGD doit être accessible et non masquée par la structure tertiaire ou quaternaire du ligand (Haas et Plow, 1994).

3.1.1.6. Les intégrines transmettent des signaux de l'environnement extracellulaire vers l'environnement intracellulaire

Les intégrines sont un des médiateurs principaux de la transduction de signaux depuis la matrice extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Ces intégrines contrôlent beaucoup de fonctions cellulaires comme la prolifération et la différenciation, l'adhésion et la migration, et la survie et les réponses cellulaires au stress. En réponse à la stimulation des intégrines, se réalise la phosphorylation des résidus tyrosine suite à la stimulation d'une activité tyrosine kinase, et notamment celle des FAK (Focal Adhesion Kinase). L'activation de cette kinase déclenche une cascade de signalisation passant notamment par la voie des Erk (Extracellular signal-regulated kinase), laquelle est importante dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire (Balda et Matter, 2003).

3.1.1.7. Les contacts focaux et hémidesmosomes

En plus de leurs fonctions de liaison aux matériaux extracellulaires et de transmission de signaux à travers la membrane plasmique, les intégrines sont aussi impliquées dans deux types de structures spécialisées : les contacts focaux et les hémidesmosomes.

A. Le contact focal

Lorsque les cellules s'étalent sur leur substrat, la face inférieure de la cellule n'est pas pressée uniformément contre le substrat. Au contraire, la membrane cellulaire n'entre en contact très étroit avec le substrat qu'en des sites dispersés et discontinus, appelés contacts focaux (figure I.4.). Au niveau du contact focal, la membrane plasmique contient divers types d'intégrines et notamment $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_5\beta_1$ reliant les matériaux extracellulaires d'une part au système de microfilaments d'actine par diverses protéines cytoplasmiques (α -actinine, taline, vinculine,...) et d'autre part aux molécules de la lamina lucida dont la laminine 5. Cet assemblage du contact focal participe à la transduction du signal, via notamment l'activation de la « Focal Adhesion Kinase » (FAK) (Kaiser et al., 1993).

B. Les hémidesmosomes

L'hémidesmosome est une structure complexe et rigide contenant une plaque dense à la face interne de la membrane plasmique à partir de laquelle s'échappent des filaments intermédiaires dans le cytoplasme du kératinocyte (figure I.3.). Contrairement aux filaments des contacts focaux formés d'actine, les filaments des hémidesmosomes sont intermédiaires et formés de kératine. L'hémidesmosome met en jeu à la fois des protéines cytoplasmiques (plectine et antigène de la pemphigoïde bulleuse de type 1/BPAG1) et transmembranaire (antigène de la pemphigoïde bulleuse de type 2/BPAG2 et l'intégrine $\alpha_6\beta_4$) (Borradori et Sonnenberg, 1996) du kératinocyte et des protéines de la matrice extracellulaire (laminine 5 et collagène VII). L'hémidesmosome permet donc l'association des filaments intermédiaires de kératine à la lame basale, de même que l'ancrage de la lame basale au derme. L'établissement des hémidesmosomes suit celui des contacts focaux (Carter et al., 1990) et induit un signal par l'activation des MAPKinases (Erk1/2) qui contrôle la prolifération des kératinocytes (Mainiero et al., 1997).

3.1.2. La perte d'ancrage du kératinocyte épidermique induit sa différenciation terminale

En 1977, une étude a démontré que les kératinocytes cultivés en suspension, cessent de proliférer et initient leur différenciation terminale (Green, 1977). Plus tard, d'autres études ont démontré que l'ancrage des kératinocytes à une matrice extracellulaire est nécessaire pour maintenir leur prolifération et constitue un régulateur négatif de leur différenciation (Adams et Watt, 1989 ; Poumay et al., 1991 ; Poumay et al., 1993 ; Watt et al., 1993 ; Levy et al., 2000). Autrement dit, l'adhésion des kératinocytes à une matrice extracellulaire joue un rôle important dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire, soulignant le rôle crucial des molécules d'adhésion de la famille des intégrines (Watt, 2002). En effet, les intégrines $\alpha_6\beta_4$ jouent un rôle majoritaire dans l'ancrage des kératinocytes à la jonction épidermo-dermique et la présence des intégrines de type β_1 assure une prolifération épidermique normale (Watt, 2002). A ce propos, il est intéressant de noter qu'une expression élevée des intégrines de type β_1 est associée aux cellules souches au sein de la couche basale ; les cellules souches sont moins mobiles que les cellules intermédiaires amplificatrices et donc restent groupées au sein de la couche basale de l'épiderme (Jensen et al., 1999). Par contre, une réduction de l'expression de ces intégrines est associée à une déplétion en cellules souches dans un épiderme murin (Waikel et al., 2001), et à une inhibition de la prolifération et une stimulation de la différenciation (Dajee et al., 2002). Le signal transduit par l'intégrine β_1 serait une instruction de type « ne te différencie pas » (produit par les récepteurs liés à un

ligand), plutôt qu'un signal positif de différenciation (qui serait alors produit par les récepteurs inoccupés).

Dans le même ordre d'idée, Poumay et al. (1991&1993) ont démontré que le détachement par la dispase de feuillets épidermiques cultivés *in vitro* et stockés pendant plusieurs heures induit la différenciation cellulaire terminale soulignant que l'adhésion des cellules basales à un substrat est nécessaire pour le maintien de l'activité proliférative normale. L'inhibition de la prolifération des cellules basales pourrait aussi résulter du changement de forme des cellules passant d'une forme étalée (en prolifération) à une forme plutôt arrondie (en différenciation). Cette forme plutôt arrondie des cellules est induite par le détachement par la dispase mais est aussi la forme rencontrée lorsque les cellules sont cultivées en suspension.

Rappelons ici que le détachement des kératinocytes déclenche l'internalisation de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ (Poumay et al. 1993). Cette internalisation diffère de l'endocytose médiée par récepteur puisque ce sont des plaques d'ancrage liées aux filaments intermédiaires qui caractérisent la majorité des puits, plutôt qu'une couche de clathrine, et que les éléments endocytés n'atteignent pas les lysosomes mais semblent plutôt recyclés.

Les intégrines jouent donc un rôle crucial dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes épidermiques.

3.2. L'adhésion intercellulaire

3.2.1. Les cadhérines

Les cadhérines constituent une grande famille de molécules d'adhésion intercellulaire dont l'efficacité est dépendante du calcium. On distingue les membres de la famille des cadhérines les uns des autres par les types de cellules sur lesquelles elles sont exprimées. Les cadhérines les mieux connues sont la cadhérine E (épithéliale), la cadhérine N (neurale) et la cadhérine P (placentaire). Ces cadhérines médient l'adhésion intercellulaire par des interactions homéophiles : une cadhérine de type E exprimée par une cellule interagit avec une cadhérine de type E sur une cellule avoisinante (Geiger et Ayalon, 1992). Les cadhérines sont des protéines transmembranaires et possèdent des domaines structuraux et fonctionnels identiques comprenant des sites pour l'adhésion, pour la fixation du calcium et pour les interactions avec les éléments du cytosquelette et notamment avec les caténines. Donc, comme une intégrine d'un contact focal, les cadhérines d'une jonction « adherens » relient l'environnement externe à l'environnement intracellulaire. Parmi les cadhérines exprimées par l'épiderme, on retrouve la cadhérine E, exprimée dans toutes les couches cellulaires, et la cadhérine P, exprimée essentiellement dans la couche basale. Ces cadhérines, en plus de jouer un rôle dans l'adhésion intercellulaire, jouent aussi un rôle important dans l'assemblage des desmosomes et dans la stratification des cellules en réponse au calcium. En effet, une faible concentration en calcium (0,06 mM par exemple) n'active pas les cadhérines et cette inactivation ne permet pas de former les interactions intercellulaires, ni la stratification des cellules et ceci même lorsque les cellules en culture sont confluentes (Boyce et Ham, 1983 ; Jensen et al., 1997 ; Tsao et al., 1982). Par contre, lorsque la concentration en calcium est plus élevée (1,0 mM), les cadhérines sont rapidement activées et les jonctions intercellulaires s'organisent. Le premier type de jonctions intercellulaires qui se forment sont les jonctions « adherens » faisant intervenir la cadhérine E ou/et la cadhérine P. L'organisation des

desmosomes débute plus tard et dépend aussi de la fonction des cadhérines classiques (Green et al., 1987).

3.2.2. Les jonctions « adherens »

Les jonctions « adherens » se trouvent à divers endroits de l'organisme, notamment dans les épithéliums et dans les tissus musculaires. Kaiser et al. (1993) ont démontré l'existence de ces jonctions dans l'épiderme. Ces jonctions se localisent autour de chaque cellule et unissent ainsi les cellules les unes aux autres. Dans l'épiderme, les cadhérines E et P sont présentes au niveau de ces jonctions et établissent les liens qui relient les cellules entre elles, lors de la fabrication du tissu. De plus, une étude a démontré que l'établissement des jonctions intercellulaires par les cadhérines influence l'expression des marqueurs de différenciation épidermiques (Hines et al., 1999). En effet, lorsque les jonctions intercellulaires sont établies par les cadhérines de type E, l'expression de certains marqueurs de différenciation tardive comme la profilaggrine et la loricrine est réprimée tandis que l'expression d'un autre marqueur de différenciation tardive, la transglutaminase1, est favorisée. Les cadhérines jouent donc un rôle important dans la régulation de la différenciation épidermique.

3.2.3. Les desmosomes

Les desmosomes sont des jonctions d'ancrage en forme de disques rencontrées dans tous les épithéliums (figure I.3.). Les plaques cytoplasmiques servent d'ancrage à des filaments intermédiaires de kératine mais peut aussi impliquer des filaments de desmine ou de vimentine. L'espace entre deux desmosomes est occupée par les domaines extracellulaires de plusieurs membres du groupe des cadhérines (les desmoglénines et les desmocollines) reliant ces domaines extracellulaires aux filaments intermédiaires via les plaques cytoplasmiques. Les desmosomes sont particulièrement nombreux dans les tissus soumis à de nombreuses contraintes mécaniques comme l'épiderme.

4. Rôle des facteurs de croissance de la superfamille de l'EGF sur la différenciation épidermique

Les facteurs de croissance sont des polypeptides produits par divers types cellulaires et se caractérisent par leur action stimulatrice ou inhibitrice de la prolifération cellulaire, mais l'action de ces facteurs dépend notamment du type de facteur qui va agir sur un type de cellule, de la coexistence d'autres signaux, d'un ancrage ou non à une matrice extracellulaire, de l'état de différenciation de la cellule qui répond au facteur et de la présence d'autres facteurs de croissance. Dans ce cas, les facteurs de croissance procurent des effets soit synergiques soit antagonistes.

Afin d'exercer son action sur la cellule cible, le facteur de croissance doit se lier à son récepteur membranaire spécifique. L'activation de ce récepteur déclenche alors une cascade d'événements propageant le signal depuis la membrane vers le noyau.

Parmi les facteurs de croissance de la superfamille de l'EGF, deux sous-familles principales sont à distinguer : les facteurs de croissance de la famille de l'EGF et les facteurs

de croissance de la famille de l'heréguline (HRG). Ces deux familles de facteurs montrent des affinités différentes pour leurs récepteurs.

4.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille des HER (Human EGF Receptor)

Au sein de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase de type I, quatre membres sont à distinguer : HER1, HER2, HER3 et HER4. Ces récepteurs à activité tyrosine kinase de type I partagent une structure assez semblable (figure I.8.). Le récepteur à l'EGF (HER1) présente :

- une séquence extracellulaire liant le ligand spécifique au type de récepteur et se caractérise principalement par la présence de deux domaines riches en cystéine,
- une séquence transmembranaire hydrophobe en hélice α permettant l'ancrage du récepteur en membrane,
- une séquence cytoplasmique portant le domaine à activité tyrosine kinase.

Les autres membres de la famille des récepteurs HER (HER2, HER 3 et HER4) possèdent un pourcentage d'identité avec HER1 variable en fonction du domaine considéré (figure I.8.).

Les récepteurs de la famille des HER se dimérisent lors de leur activation (Yarden et Sliwkowski, 2001 ; Wiley, 2003). Lorsque le ligand se lie au récepteur spécifique, il recrute un récepteur secondaire par un domaine à faible affinité. Cette dimérisation de récepteurs est caractéristique des récepteurs à activité tyrosine kinase et entraîne une phosphorylation intermoléculaire (transphosphorylation) des résidus tyrosine des domaines cytoplasmiques. Les résidus tyrosine ainsi phosphorylés vont servir de sites d'ancrage pour des protéines à domaines SH2 (Src Homology 2) comme par exemple Grb2, impliquées dans la transduction du signal. La protéine Grb2 possède non seulement un domaine SH2 mais aussi deux domaines SH3. Le domaine SH3 contient un site de liaison pour des séquences riches en proline et est impliqué dans la liaison de Grb2 avec SOS (une « guanine nucleotide exchange factor »). SOS va alors stimuler l'échange du GDP en GTP sur la protéine Ras. Ras recrute ainsi Raf qui phosphoryle et donc active Mek (MAPKinase Kinase) qui à son tour va phosphoryler Erk sur des résidus tyrosine et thréonine. Erk activé est alors transloqué dans le noyau où il phosphoryle diverses protéines intervenant dans la réponse de la cellule à la stimulation par le facteur de croissance (figure I.9.).

La réponse à la stimulation par un facteur de croissance prend fin par un phénomène de désensibilisation et d'internalisation. La désensibilisation consiste en la phosphorylation de résidus sérine et thréonine, localisés dans le domaine cytoplasmique du récepteur HER, par l'intermédiaire de la protéine kinase C afin d'inhiber l'activation du récepteur, mais consiste aussi en l'activation de protéines phosphatases déphosphorylant les tyrosines du récepteur (Jorissen et al., 2003). L'internalisation des récepteurs permet de diminuer le nombre de récepteurs présents en membrane plasmique. Une fois séquestrés dans les endosomes précoces, certains récepteurs peuvent être recyclés, mais généralement les récepteurs de la famille des HER sont dégradés par ciblage vers les lysosomes (Wiley, 2003).

Tous les récepteurs de la famille des HER possèdent des sites d'ancrage pour la protéine Grb2 qui entraîne l'activation de la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) passant par la phosphorylation de Erk (Erk1 et Erk2) et aboutissant à l'activation de facteurs de transcription c-fos et c-jun jouant un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire.

Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF se lient préférentiellement au récepteur HER1 (Jorissen et al., 2003), alors que les facteurs de croissance de la famille de l'HRG se lient préférentiellement à HER3 et HER4 (Peles et al., 1993) (figure I.10.). Le récepteur HER2 n'a pas de ligand connu (Dougall et al., 1994) (figure I.10.) et s'associe par hétérodimérisation en réponse à l'HRG avec HER3 ou HER4 en fonction de la présence de l'un ou l'autre du type de récepteur (Peles et al., 1993), tandis qu'il se lie à HER1 en réponse à l'EGF (Goldman et al. 1990). Quand il est présent, le récepteur HER2 constitue le récepteur préférentiel pour l'hétérodimérisation avec HER3 ou HER4, et ceci au détriment de la formation d'autres homo- ou hétérodimères (Graus-Porta et al., 1997).

4.1.1. Le récepteur de l'EGF (EGFR)/c-erbB-1/HER1

Le récepteur à l'EGF est une glycoprotéine transmembranaire de 170 kDa et fut le premier membre isolé d'une famille de récepteurs à activité tyrosine kinase nommée la famille des HER (Human EGF Receptor) (Prigent et Lemoine, 1992). Appelé c-erbB en raison de la similitude de son gène avec le gène v-erbB du virus de l'érythroblastose aviaire, (Ullrich et al., 1984) c-erbB-1 est un proto oncogène dont la surexpression est associée à un mauvais pronostic de guérison chez des individus atteints de cancer (cancer du sein, cancer de l'œsophage,...). L'implication de ce récepteur dans l'épiderme, et plus particulièrement dans la régulation de la prolifération des kératinocytes, a été suggérée par de nombreuses études (Rheinwald et Green, 1977; Wille et al., 1984).

4.1.2. Le récepteur neu/c-erbB-2/HER2

Le récepteur HER2 est une glycoprotéine transmembranaire de 185 kDa et est le produit de l'oncogène c-erbB-2, aussi désigné « neu » oncogène chez le rat pour son implication dans des neuroblastomes. Le récepteur HER2 a fortement attiré l'attention sur lui car ce récepteur est surexprimé dans des cancers humains du sein et ovariens dont le pronostic est défavorable (Slamon et al., 1989). L'expression normale de HER2 dans la peau humaine a été détectée (Maguire et al., 1989) et a été associée à la différenciation épidermique suite à l'observation d'une distribution inverse de HER1 et HER2 dans un épiderme humain normal (Maguire et al., 1989). Jusqu'à présent, aucun ligand pour HER2 n'a été identifié.

4.1.3. Le récepteur c-erbB-3/HER3

Le récepteur HER3 est une glycoprotéine transmembranaire de 180 kDa et le produit du gène c-erbB-3. Ce récepteur a été identifié par hybridation à faible stringence d'ADN génomique humain avec une sonde provenant du gène v-erbB (Kraus et al., 1989). Ce récepteur HER3 a été détecté dans les kératinocytes épidermiques humains (Kraus et al., 1989; Peles et Yarden, 1993) et sa localisation a été confirmée par analyse immunohistochimique (Prigent et Lemoine, 1992). Guy et al. (1994) ont cependant démontré que le récepteur HER3 possède une activité tyrosine kinase déficiente suite à la substitution d'un aspartate en position 838 par une asparagine. Par contre, le récepteur HER3 possède au niveau de son domaine cytoplasmique un nombre plus élevé (13) de sites potentiels de phosphorylation par rapport aux autres membres de la famille des HER, suggérant que malgré son activité tyrosine kinase déficiente, le récepteur HER3 peut être phosphorylé par d'autres récepteurs tyrosines kinases et déclencher ainsi un signal à l'intérieur de la cellule (Sliwkowski et al., 1994).

4.1.4. Le récepteur c-erbB-4/HER4

Le récepteur HER4 est une glycoprotéine transmembranaire de 180 kDa et est le produit du gène c-erbB-4. Ce dernier membre de la famille des récepteur HER a été identifié par criblage d'une banque de cDNA réalisée à partir de cellules cancéreuses en utilisant une sonde produite par RT-PCR à partir de diverses lignées cellulaires de cancer mammaire et d'une paire d'amorces dégénérées (Plowman et al., 1993). Cependant, seulement une expression très faible ou non détectable de l'expression de HER4 est observée dans l'épiderme humain (Plowman et al., 1993), tout comme dans l'épiderme murin (Xian et al., 1997) et ceci malgré une grande homologie avec les autres membres des récepteurs de la famille des HER. HER 4 n'est pas exprimé dans les kératinocytes humains en culture (De Potter et al. 2001).

4.2. Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF

L'Epidermal Growth Factor (EGF) est un polypeptide de 53 acides aminés dérivant d'un clivage protéolytique de son précurseur transmembranaire (pro-EGF) de 1207 acides aminés (Harris et al., 2003) (figure I.10.). L'EGF a été détecté dans les glandes sous-maxillaires et isolé par Stanley Cohen (1960) par sa capacité à stimuler l'éruption des incisives et l'ouverture des paupières des souriceaux nouveaux-nés. Ces observations suggèrent aussi le rôle de l'EGF dans la prolifération et la différenciation épidermiques (Elder, 1994).

Le précurseur transmembranaire de l'EGF s'organise en trois régions distinctes :

- une séquence extracellulaire contenant 9 domaines EGF-like dont un domaine est clivé par une arginine estérase et libère ainsi la forme mature soluble du facteur de croissance,
- une séquence hydrophobe permettant l'ancrage en membrane,
- une séquence cytoplasmique.

La forme active de l'EGF est une protéine de 53 acides aminés et de poids moléculaire de 6kDa. Chacune des formes matures des facteurs de croissance de la famille de l'EGF (TGF α , AR, HB-EGF) est caractérisée par une séquence consensus consistant en 6 résidus cystéine très conservés formant 3 ponts disulfures intramoléculaires importants pour la conformation du facteur, et donc pour son activité biologique. Cette séquence consensus représente le motif EGF et est crucial pour la liaison au récepteur spécifique.

In vivo, l'EGF stimule la prolifération des cellules épithéliales de la peau, du poumon, de la cornée, de la trachée et du tractus intestinal. *In vitro*, l'effet de l'EGF semble dépendre de la présence d'autres facteurs. Il a notamment été suggéré que la coexistence d'autres signaux pourrait modifier l'activité de l'EGF sur la prolifération ou sur la différenciation. Par exemple, l'EGF seul est mitogène dans certaines cellules, alors que la combinaison de l'EGF et de l'AMPc induit la différenciation de ces mêmes cellules (Wakita et Takigawa., 1999).

Malgré son implication dans la prolifération des cellules épithéliales de la peau, l'EGF de façon surprenante n'est pas exprimé dans l'épiderme (Byyny et al., 1972). La découverte d'un facteur exprimé dans l'épiderme, le Transforming Growth Factor α (TGF α) a permis de concevoir l'absence d'EGF. Le TGF α est un facteur de croissance très semblable à l'EGF par sa structure et sa fonction, puisqu'il est capable de se lier au récepteur de l'EGF et de l'activer. D'autres facteurs de croissance exprimés dans l'épiderme et capables de se lier au

récepteur de l'EGF ont été ensuite identifiés : il s'agit de l' amphiréguline (AR) et l' « heparin-binding-EGF-like » (HB-EGF) (Elder , 1994).

Ces facteurs contiennent tous le motif EGF-like (figure I.11.) et se lient au récepteur de l'EGF, ce qui permet de les classer dans la famille de l'EGF.

4.3. Les facteurs de croissance de la famille de l'HRG

Le Neu Differentiation Factor (NDF) ou Héréguline (HRG) est une glycoprotéine de 44 kDa et fait partie de la superfamille des facteurs de croissance de l'EGF. Les neurégulines ont été identifiées pour la première fois en 1992 et 1993 par quatre groupes. Deux de ces groupes cherchaient un ligand pour le produit de l'oncogène ErbB2. Ce facteur, d'abord isolé à partir de milieu de culture conditionné de fibroblastes de rat transformés par l'oncogène ras, fut nommé Neu Differentiation Factor ou Héréguline en raison de son rôle pro-différenciateur sur des lignées cellulaires de cancers mammaires surexprimant le récepteur HER2 (Holmes et al., 1992 ; Peles et al., 1992 ; Wen et al., 1992). Le troisième groupe cherchait un facteur stimulant la prolifération de cellules du système nerveux (cellules de Schwann) (Goodearl et al., 1993 ; Marchionni et al., 1993) et le quatrième groupe cherchait un facteur stimulant la synthèse par les muscles au niveau de la plaque motrice des récepteurs de l'acétylcholine (Falls et al., 1993). D'après les fonctions décrites, les différents membres de la famille de l'HRG ont été respectivement nommés « Glial Growth Factor » (GGF) ou « Acetylcholine Receptor Inducing Activity » (ARIA). Puis, la dominance de ces facteurs dans le système nerveux et la relation existant entre ces facteurs et le récepteur neu/c-erbB-2/HER2 a suggéré de les renommer « neurégulines » (Marchionni et al., 1993 ; Peles et Yarden., 1993). Dans la suite de notre travail, nous avons conservé le terme Héréguline (HRG) faisant référence à leurs interactions avec les récepteurs HER.

Les facteurs de croissance de la famille de l'HRG sont des glycoprotéines synthétisées sous la forme d'un précurseur transmembranaire, le pro-NDF (figure I.12.), qui s'organise en plusieurs domaines distincts :

- le domaine extracellulaire comprenant :
 - une unité homologue des immunoglobulines (domaine Ig-like) contenant deux cystéines très conservées permettant la formation d'un pont disulfure entre deux feuillets β . Le rôle de ce domaine est la stabilisation des interactions homophiliques entre protéines.
 - Un domaine spacer reliant le domaine Ig-like et le domaine EGF-like, et composé principalement de résidus sérine et thréonine. La présence de sucre O-liés et N-liés caractérise aussi ce domaine, ainsi que la présence d'une séquence liant l'héparan sulfate (constituant de la matrice extracellulaire). La liaison de ces différents sucres semble participer au maintien de la forme allongée de la protéine afin que les domaines Ig-like et EGF-like soient accessibles.
 - Un domaine EGF-like typique des membres de la superfamille de l'EGF, possède une séquence contenant six cystéines très conservées permettant la formation de ponts disulfures, eux-mêmes responsables de la formation de boucles caractéristiques de ce domaine. C'est la séquence de la boucle formée par les cystéines qui détermine l'isoforme de l'HRG (α ou β). Ce domaine EGF-like est aussi responsable de la spécificité de liaison au récepteur tyrosine kinase de la protéine mature relarguée.
 - Un domaine juxtamembranaire relie le domaine extracellulaire de la protéine au domaine transmembranaire et présente des sites de clivage protéolytiques suggérant ainsi le relargage de la protéine mature en fonction de la disponibilité des protéases.
 - Le domaine hydrophobe transmembranaire permettant l'ancrage en membrane de la protéine précurseur.

- Le domaine cytoplasmique se caractérise par une séquence invariable de 157 acides aminés, puis d'une séquence variable définissant trois isoformes différentes (a, b ou c). Ce domaine est riche en résidus sérine et thréonine situés pour certains dans des sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C et la caséine kinase II, et pourrait contrôler le taux de relargage de la protéine précurseur ou participer à la signalisation cellulaire.

La diversité des isoformes d'HRG provient de la combinaison d'exons par épissage alternatif. Une première classification différencie les isoformes α des isoformes β . C'est la séquence de la boucle C-terminale formée par les résidus cystéines du domaine EGF-like qui est responsable de cette distinction. Les deux types d'isoformes ne montrent pas de variation dans la spécificité de liaison, mais bien dans l'affinité de liaison au récepteur. En effet, les isoformes β ont une affinité de liaison 10 fois supérieure à celle des isoformes α (Wen et al., 1994). Ajoutons encore que parmi ces deux types d'isoformes, quatre sous-types sont à distinguer (1, 2, 3 et 4) en fonction de la séquence de la région juxtamembranaire, mais ces sous-types ne montrent pas de variations significatives de leurs affinités respectives. La présence de la séquence variable au sein du domaine cytoplasmique divise encore les sous-types d'isoformes en trois (a, b et c) en fonction de la taille de la queue cytoplasmique. Cette région cytoplasmique rencontrée uniquement chez les précurseurs pourrait avoir un rôle dans le taux de clivage de la protéine précurseur.

Trois autres gènes codant pour des protéines apparentées à l'HRG ont été découverts et sont nommés NRG2 (Busfield et al., 1997), NRG3 (Zhang et al., 1997) et NRG4 (Harari et al., 1999). Ces facteurs récemment identifiés dans le système nerveux lient les récepteurs HER3 et/ou HER4 (Yarden et Sliwkowski, 2001).

4.4. Effet des facteurs de croissance de la superfamille de l'EGF sur l'expression des marqueurs de différenciation des kératinocytes épidermiques

L'Epidermal Growth Factor (EGF) est un facteur de croissance exerçant une action mitogène sur les kératinocytes épidermiques. En effet, une étude a démontré que le traitement de kératinocytes en pleine prolifération par l'EGF dès le début de la culture autocrine inhibe la différenciation épidermique (Poumay et Pittelkow, 1995) par la suppression de l'expression des kératines suprabasales 1 et 10. Cependant, une autre étude a montré que le traitement en présence d'EGF de kératinocytes épidermiques cultivés en suspension induit la différenciation terminale de ces kératinocytes (Wakita et Takigawa., 1999). Dans ces conditions de suspension, l'EGF semble favoriser l'expression des marqueurs de différenciation tardive comme la filaggrine, l'involucrine et la transglutaminase et semble réprimer l'expression des marqueurs de différenciation précoces comme la kératine 10. Cette étude suggère que la perte d'attache à une matrice extracellulaire favorise la différenciation épidermique et que l'addition d'EGF accélère encore cette différenciation, soulignant ainsi que l'activité de l'EGF peut passer d'un effet prolifératif en culture adhérente, à un effet différenciateur en culture en suspension.

L'Heréguline (HRG) est exprimée par les kératinocytes épidermiques humains (De Potter et al., 2001). Il a été démontré que l'isoforme β de l'HRG imite l'EGF dans sa capacité de retarder la mise en place du processus de différenciation initié normalement par les kératinocytes lors de l'augmentation de la densité cellulaire des cultures autocrines et ceci par une inhibition de l'expression des kératines suprabasales 1 et 10 (De Potter et al., 2001). Par contre, lorsque les kératinocytes ont déjà entamé leur processus de différenciation, il se

pourrait que l'HRG et d'autant plus l'isoforme α active le processus de différenciation, par une augmentation de l'expression de la kératine 10 notamment (De Potter et al. 2001).

5. Objectif

L'épiderme est un épithélium stratifié possédant un type cellulaire majoritaire, le kératinocyte. Dans un épiderme normal, la prolifération des kératinocytes se confine à la couche basale, mais lorsque les kératinocytes quittent cette couche basale pour rejoindre les couches suprabasales, ils cessent de proliférer et amorcent leur processus de différenciation aboutissant à la formation de la couche cornée. Cette couche cornée, biologiquement morte mais fonctionnellement active, procure un effet protecteur de l'épiderme contre les agressions externes. Au sein de cet épiderme doit régner un équilibre précis entre la prolifération, la différenciation et finalement la desquamation des kératinocytes. En effet, une perturbation de cet équilibre peut entraîner l'apparition de diverses pathologies telles que le psoriasis (pathologie hyperproliférative).

Les facteurs de croissance de la superfamille de l'EGF assurent un rôle important dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation du kératinocyte épidermique. Une étude a démontré que l'EGF diminue l'expression des kératines suprabasales 1 et 10 dans des kératinocytes épidermiques en culture autocrine (Poumay et Pittelkow, 1995). Par ailleurs, une autre étude a démontré un effet pro-différenciateur de l'EGF sur des kératinocytes épidermiques cultivés en suspension, notamment par une augmentation de l'expression de marqueurs de différenciation tardive (Wakita et Takigawa., 1999). Dans ce contexte, nous avons voulu vérifier l'effet de l'EGF sur des kératinocytes épidermiques cultivés en suspension en milieu autocrine (1^{er} objectif).

Parallèlement, puisque les Herégulines sont des facteurs exprimés dans l'épiderme humain (De Potter et al., 2001) qui semblent influencer également la prolifération et la différenciation des kératinocytes épidermiques en culture autocrine (De Potter et al., 2001), nous avons alors réalisé une étude portant sur l'effet de ces herégulines (isoformes α et β) sur des kératinocytes épidermiques cultivés en suspension et en milieu autocrine, afin de savoir si les herégulines contrôlent aussi dans ces conditions la différenciation terminale des kératinocytes (2^{ième} objectif).

MATERIEL ET METHODES

1. Culture des kératinocytes épidermiques humains

1.1. Matériel

Solution A :

- glucose 10,0 mM
- KCl 3,0 mM
- NaCl 130,0 mM
- Na_2HPO_4 1,0 mM
- Rouge phénol 0,0033 mM
- Hepes 30,0 mM
- pH 7,4 , solution stérilisée par filtration sur Stérivex-GV 0,22µm

Trypsine T17 :

- Solution A
- Trypsine 0,17%

Trypsine T25 :

- Solution A
- Trypsine 0,025%
- EDTA 0,01M

Solution de Poly-HEMA :

- Poly(2-hydroxyéthylméthacrylate)10ng/ml (SIGMA)
- Ethanol 95%

Milieu autocrine :

- Epilife Medium (SIGMA)
- Acides aminés : L-histidine $2,4 \times 10^{-4}$ M, L-isoleucine $7,5 \times 10^{-4}$ M, L-méthionine 9×10^{-5} M, L-phénylalanine 9×10^{-5} M, L-tryptophane $4,5 \times 10^{-5}$ M, L-tyrosine $7,5 \times 10^{-5}$ M
- Hydrocortisone 5×10^{-7} M
- 50 unités/ml pénicilline G
- 50 µg/ml streptomycine

Milieu complet :

- KGM-2(Keratinocyte Growth Medium) (CLONETICS)

+ suppléments :

- BPE (Bovine Pituitary Extract) 0,2%
- hEGF 0,2 ng/ml
- Insuline 5 µg/ml
- Hydrocortisone 5×10^{-7} M
- Transferrine 5 µg/ml
- Epinéphrine
- 50 unités/ml pénicilline G
- 50 µg/ml streptomycine

-Epilife Medium (SIGMA)

+suppléments :

- BPE (Bovine Pituitary Extract) 0,2%
- hEGF 0,2 ng/ml
- Hydrocortisone 0,18 µg/ml
- Insuline 5 µg/ml
- Transferrine 5 µg/ml
- 50 unités/ml pénicilline G
- 50 µg/ml streptomycine

Solution bloquante :

- KGM-2
- Sérum de veau fœtal dialysé (dFCS) 2%

1.2 Méthode

1.2.1 Etablissement des cultures primaires de kératinocytes à partir des prélèvements cutanés

Les kératinocytes épidermiques humains sont obtenus à partir d'abdominoplasties pratiquées par le Docteur Bienfait, clinique Saint-Luc à Bouge. Les prélèvements sont récoltés immédiatement après l'intervention et stockés à 4°C. Les opérations ultérieures se réalisent stérilement sous hotte à flux vertical selon un protocole modifié de Wille et al. (1984).

Les prélèvements sont débités en petits carrés de 1 cm de côté dans de la solution A. Ces petits carrés sont ensuite déposés côté derme sur une solution de trypsine de pancréas bovin 0,17% (T17) et incubés une nuit à 4°C dans cette solution. Le lendemain, l'épiderme est détaché du derme et placé dans une solution bloquante à base de milieu complet sans sérum (KGM-2) et de sérum de veau foetal dialysé (dFCS) 2% (neutralisant l'action de la trypsine). Les morceaux d'épiderme sont triturés, les cellules sont séparées les unes des autres par plusieurs passages dans une pipette, et passées sur tamis cellulaire 70 µm (FALCON) afin d'éliminer les agrégats. La suspension cellulaire qui a traversé le tamis est centrifugée à 1000

RPM pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est ôté et les cellules sont resuspendues dans un petit volume de milieu complet (KGM-2).

Ces kératinocytes épidermiques constituant la culture primaire sont ensemencés dans des boîtes de 175cm² en présence de milieu complet (KGM-2) et de dFCS 0,1% (favorisant l'adhésion cellulaire) et incubés dans une étuve à 37°C sous une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le milieu est renouvelé tous les deux jours.

1.2.2. Etablissement des cultures secondaires et tertiaires de kératinocytes

Avant que la culture n'arrive à confluence, les kératinocytes sont détachés de leur support par ajout d'une solution de trypsine de pancréas bovin 0,025% et EDTA (T25). L'action de la trypsine est alors inhibée par l'utilisation de la solution bloquante et les cellules sont récupérées, centrifugées, et comptées. L'ensemencement secondaire se réalise dans des boîtes de 175cm² en présence de milieu complet Epilife favorisant la prolifération cellulaire par une concentration en calcium faible (0,06 mM) et la culture est menée à une densité proche de la confluence.

A ce stade, les kératinocytes peuvent être congelés pour leur stockage. Pour ce faire, les kératinocytes sont détachés comme décrit ci-dessus, centrifugés, comptés et resuspendus à raison de 2 millions par ml de milieu complet auquel est additionné un volume équivalent de milieu de congélation (DMSO 20%, dFCS 20%, milieu complet). Les cellules sont alors réparties dans des cryotubes (NUNC 1 ml), congelées une nuit à – 80°C dans une boîte isolante puis transférées en azote liquide à – 180°C.

Les cultures tertiaires se réalisent à partir des cultures secondaires ensemencées dans du milieu complet (KGM-2) à une densité de 7000 cellules/cm². Le lendemain, le milieu de culture est ôté et remplacé par l'autre type de milieu complet (Epilife) afin d'éliminer les traces de DMSO toxiques pour la poursuite de la croissance et d'assurer la prolifération cellulaire. Les kératinocytes verront leur milieu renouvelé tous les 2 jours. Lorsque les cellules occupent approximativement 50% de la surface de la boîte, les facteurs peptidiques exogènes sont ôtés du milieu. Ce milieu autocrine est remplacé tous les 2 jours et les cellules vont successivement générer des cultures sous-confluentes, confluentes ou post-confluentes (Poumay et al., 1999).

1.2.3. Etablissement des cultures en suspension

Tout d'abord, il faut savoir que l'obtention de cultures en suspension nécessite un nombre considérable de cellules. Pour ce faire, des kératinocytes provenant de cultures secondaires sont ensemencés à densité élevée dans des boîtes de 175cm² en présence de milieu complet Epilife (favorisant la prolifération cellulaire par une concentration en calcium faible : 0,06 mM) et amplifiés par détachement à la trypsine 0,025% et réensemencement. Le milieu de culture (Epilife) est remplacé tous les deux jours afin d'obtenir suffisamment de cellules (96 x10⁶) pour l'ensemencement des boîtes.

La culture en suspension des cellules est permise par l'utilisation du polyhydroxyéthylméthacrylate (Poly-HEMA), lequel empêche les interactions des cellules avec leur matrice extracellulaire tout en autorisant les interactions entre elles.

Le traitement des boîtes de culture se réalise préalablement en y déposant 4ml de solution de poly-HEMA que nous laissons sécher stérilement sous hotte à flux vertical et sur plateau basculant afin de répartir de façon homogène le poly-HEMA. Cette opération est répétée une fois, puis les boîtes de culture sont rincées deux fois à la solution A afin d'éliminer les traces d'éthanol (Frisch et Francis, 1994)

Les kératinocytes sont ensemencés à raison de 8×10^6 par boîte de pétri de 78,5cm² en présence de milieu autocrine et incubés dans une étuve à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂ pendant 24 ou 48 heures.

2. Analyse des transcrits

Toutes les manipulations d'ARN requièrent l'utilisation de matériel traité au diéthyl pyrocarbonate (DEPC) et autoclavé afin d'éliminer toute trace d'ARNases. L'utilisation de gants est aussi nécessaire pour éviter les contaminations possibles par les ARNases de la peau.

2.1. Isolement des ARNm poly(A)

2.1.1. Matériel

H₂O traitée DEPC

- 500ml H₂O
- traité avec 0,1% de DEPC et autoclavé

Tampon riche en sels :

- Tris-HCl 0,01 M
- NaCl 0,5 M
- EDTA 0,001 M
- SDS 0,2%
- traité avec 0,1% de DEPC et autoclavé

Tampon pauvre en sels :

- Tris-HCl 0,01 M
- NaCl 0,1 M
- EDTA 0,001 M
- SDS 0,2%
- Traité avec 0,1% de DEPC et autoclavé

Tampon sans sel :

- Tris-HCl 0,005 M
- EDTA 0,001 M
- SDS 0,2%
- Traité avec 0,1% de DEPC et autoclavé

Tampon de lyse :

- Tris-HCl 0,01 M
- NaCl 0,1 M
- EDTA 0,002 M
- SDS 1%
- Traité avec 0,1% de DEPC et autoclavé

Tampon TE :

- Tris base 9 mM
- EDTA-2H₂O 0,9 mM
- pH 8

2.1.2.Méthode

Avant de procéder à l'extraction des ARN messagers (ARNm), la préparation d'oligo-dT est requise afin de séparer les ARNm poly(A) des autres types d'ARN (ARN ribosomal, ARN de transfert). Ces oligo-dT consistent en des chaînes de 30 nucléotides comprenant uniquement des bases thymidines. Ces chaînes sont attachées de façon covalente à la cellulose par leur extrémité 5'-phosphate. Lorsque les conditions ioniques sont adéquates (concentration en sels élevée), la thymidine s'apparie avec l'adénosine par la formation de ponts hydrogène. Les oligo-dT cellulose doivent être préalablement traités avant leur utilisation. Pour cela, une quantité d'environ 0,025 g pour une boîte de culture de 75cm², ou bien d'environ 0,050 g pour une boîte de culture de 175cm² est lavée 2 fois dans du NaOH 0,1M, puis rincée 1 fois à l'eau distillée. Les oligo-dT cellulose sont alors incubés 30 minutes en présence de DEPC 0,1% puis lavés 3 fois à l'eau traitée DEPC et enfin, lavés 1 fois avec du tampon riche en sels. Après ce dernier lavage, les oligo-dT cellulose sont resuspendus dans ce même tampon à raison de 2ml par boîte et stockés à 4°C durant 2 semaines maximum.

L'extraction des ARNm poly(A) se réalise selon Schwab et al. (1983) en ôtant le milieu de culture de chaque boîte et en y déposant du tampon de lyse (6ml pour les boîtes de 75cm² et 12ml pour les boîtes de 175cm²) contenant de la protéinase K à une concentration stock de 20 µg/µl (7,5µl pour les boîtes de 75cm² et 15µl pour les boîtes de 175cm², sérine protéase non spécifique utilisée afin d'inactiver les nucléases endogènes comme les ARNases ou les ADNases). En ce qui concerne les cultures en suspension, une centrifugation des cellules est nécessaire afin d'ôter le milieu de culture et de pouvoir déposer également le tampon de lyse contenant la protéinase K. Lorsque le lysat devient visqueux, il est récupéré et passé 6 à 8 fois au travers d'une seringue 21 G (afin de casser l'ADN). La concentration en protéinase K est alors ajustée de façon à obtenir une concentration finale de 75 µg/ml et le lysat est incubé 30 minutes à 37°C. La concentration initiale en sel dans le lysat (0,1 M) est portée à 0,5 M par l'ajout de NaCl 5 M (une forte concentration en sels est requise pour permettre la fixation des ARNm poly(A) aux oligo-dT cellulose). Les oligo-dT cellulose préalablement traités sont additionnés au lysat et incubés durant 2 heures au minimum, sur plateau basculant à température ambiante. Après cette incubation, les ARNm poly(A) sur oligo-dT cellulose sont centrifugés et lavés dans le tampon riche en sels, puis resuspendus dans ce même tampon et déposés sur une colonne (Poly-prep chromatography column, Bio-Rad) traitée DEPC et munie d'un filtre en polymère poreux retenant les ARNm poly(A) sur oligo-dT cellulose. L'utilisation d'une solution faiblement concentrée en sels va permettre de décrocher les hybridations non spécifiques éventuelles. L'élution des ARNm poly(A) se réalise par l'utilisation d'une solution sans sels à 55°C ne permettant plus de maintenir les ponts hydrogènes entre les bases. La concentration finale en sels de l'éluat est réajustée à 0,5 M et les ARNm poly(A) sont précipités une nuit à - 20°C par ajout de 2 fois le volume d'éthanol froid 95%. Le lendemain, les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 12000 RPM, à 4°C et les culots sont séchés puis resuspendus dans 25 µl de tampon TE contenant 1 µl/ml de protéinase K. La mesure de la concentration en ARNm poly(A) est alors effectuée sur un échantillon dilué 35x (2 µl échantillon dans 68 µl de tampon TE) par la lecture de la densité optique à 260 nm (permettant de déceler les contaminations protéiques) et à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Genequant (Pharmacia). Les échantillons d'ARNm sont stockés à - 80°C.

2.2. Northern blot

2.2.1. Matériel

MOPS 10X :

- 0,2 M MOPS (3-N-morpholino-propane sulfonic acid)
- 50 mM acétate de sodium
- 10 mM EDTA

Sample buffer:

- 50% formamide désionisée
- 6,5% formaldéhyde
- MOPS 1X (3-N-morpholino-propane sulfonic acid)

Tampon d'électrophorèse

- MOPS 1X (3-N-morpholino-propane sulfonic acid)
- 3,3% formaldéhyde

20X SSC:

- 2,9 M NaCl
- 0,29 M citrate de sodium

Gel d'électrophorèse :

- 1,2% agarose ultraPure (GibcoBRL)
- solution tamponnée (0,2 M MOPS, 50 mM acétate de sodium tri-hydraté, 10 mM EDTA, pH 7)
- 6,5% formaldéhyde

2.2.2.Méthode

La quantité d'échantillon que l'on désire déposer sur le gel est déshydratée au Speedvac. Le culot est resuspendu dans du « sample buffer ». Parce que l'ARN est riche en structures secondaires, les échantillons sont incubés 35 minutes à 65°C puis placés immédiatement sur glace. Avant de déposer les échantillons sur gel d'agarose, celui-ci doit subir une polarisation à 75 volts pendant 10 minutes. La polarisation terminée, les ARNm sont séparés au même voltage mais durant 3 heures. Après la migration des échantillons, le gel d'agarose est lavé 4 fois durant 10 minutes à l'eau distillée afin d'éliminer le maximum de formaldéhyde.

La membrane de nylon (Bio-Rad, Zeta Probe GT) sur laquelle seront transférés les ARNm est mouillée tout d'abord dans l'eau distillée, puis dans le 20X SSC. Le transfert se réalise à l'aide du « Turbo Blotter » de Schleicher & Schuell (appareillage et filtres), durant une nuit dans le 20X SSC. Le lendemain, les ARNm sont fixés de façon covalente sur la membrane de nylon par une exposition au U.V. 150 millijoules/cm². La membrane est ensuite emballée dans du papier filtre pour sa conservation ou est hybridée.

2.3. Hybridation des Northern blots par sondes ADN marquées au ³²P

2.3.1. Matériel

Tampon d'hybridation :

- 0,12 M Na₂HPO₄
- 0,25 M NaCl
- Sodium Dodécyl Sulfate 7%
- 50% de formamide désionisée
- pH 7,2

20X SSC:

- 2,9 M NaCl
- 0,29 M citrate de sodium
- pH 7

Kit Random Priming (Invitrogen) :

- Random Primers Buffer Mixture (0,67 M HEPES, 0,17 M Tris-HCl, 17 mM MgCl₂, 33 mM 2-mercaptoethanol, 1,33 mg/ml BSA, 18 OD₂₆₀unités/ml oligodeoxyribonucleotide primers (hexamers), pH 6,8)
- solution de dNTP : 0,5 mM dNTP dans 1 mM Tris-HCl (pH 7,5)
- Klenow Fragment : 3 U/μl
- Stop Buffer: 0,5 M EDTA, pH 8
- distilled water

2.3.2. Méthode

2.3.2.1. Préparation des membranes

Les membranes sont superposées en intercalant un treillis de nylon entre chacune afin d'écoper les différentes solutions utilisées par la suite, et ceci dans du 2X SSC. Le tout est roulé en cigare et placé dans une bouteille à hybridation Hybaid en présence de 2X SSC en veillant à bien étaler le montage sur les parois de la bouteille. Cette solution est ensuite remplacée par un premier volume de solution d'hybridation (10 ml pour les small bottles et 13 ml pour les medium bottles) chauffée préalablement à 43°C puis vidée et remplacée par un second volume de cette même solution. La bouteille d'hybridation est placée sur la râtisserie dans le four à hybridation (Micro-4 Hybaid) à 43°C pendant 1 heure.

Toutes les hybridations de membranes sont réalisées après décrochage des sondes précédentes. Pour cela, les membranes sont placées dans le four à 80°C et incubées avec de la solution de « décrochage ». La bouteille est ensuite placée 10 minutes dans un bain à ébullition en présence de cette même solution. Les membranes sont alors replacées dans le 2X SSC à 43°C, puis dans la solution d'hybridation.

2.3.2.2. Préparation des sondes marquées au ^{32}P et hybridation des membranes

Les sondes utilisées lors des expériences d'hybridation des membranes de Northern blots sont reprises dans le tableau M.I. avec leurs caractéristiques et leurs origines.

Les différentes sondes utilisées pour l'hybridation des membranes sont préparées par « Random Priming » et incorporation de (α - ^{32}P) dCTP (50 μCi , Isobblue, ICN) à partir des produits de restriction (20 ng).

Afin de séparer les brins appariés, la sonde est dénaturée 5 minutes dans un bain à ébullition puis placée, immédiatement sur glace (pour éviter les réappariements). La polymérisation se réalise par l'utilisation du Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen) comprenant des Random Primers (hexamères synthétisés de manière aléatoire s'hybridant au produit de restriction), des nucléotides (dATP, dGTP, et dTTP), d'une DNA polymérase (Klenow fragment ou grand fragment de la DNA polymérase) et par incorporation de nucléotides dCTP marqués au ^{32}P . Après une incubation d'1 heure 30 minutes à température ambiante, la sonde radioactive est ensuite purifiée par passage sur une colonne de chromatographie Bio-Spin 30 (Bio-Rad) centrifugée à 2500 RPM. Un μl de sonde est prélevé afin d'estimer l'activité incorporée grâce à un compteur à scintillation BECKMAN LS 6000 IC. Une bonne incorporation varie entre 10^5 et 5×10^5 cpm et peut aller jusqu'à 2×10^6 cpm par μl de sonde. Après cette estimation, les brins appariés de la sonde sont séparés en plaçant la sonde dans un bain à ébullition puis immédiatement refroidie sur glace. Cette sonde radioactive est alors ajoutée à 10 ml de solution d'hybridation, et le tout remplace la solution d'hybridation utilisée auparavant pour la préparation des membranes dans la bouteille du four à hybridation. L'hybridation se déroule une nuit à 43°C .

2.3.2.3. Lavages des membranes

Après une nuit d'incubation à 43°C , les membranes sont lavées tout d'abord 3 fois 15 minutes avec la solution 2X SSC/0,1% SDS à 25°C , puis 2 fois 15 minutes avec la solution 0,5X SSC/0,1% SDS à 43°C et enfin 2 fois 15 minutes avec la solution 0,5X SSC/0,1% SDS à 65°C . Ces différents lavages vont permettre de décrocher toutes les hybridations non spécifiques. En ce qui concerne les kératines, 3 lavages supplémentaires avec la solution 0,1X SSC/0,1% SDS à 65°C sont nécessaires pour ne conserver que les hybridations hautement spécifiques.

2.3.2.4. Révélation des membranes

Chaque membrane est alors emballée dans du papier cellophane et exposée sur un écran de phosphore (Storage Phosphore Screen, Packard). Les cristaux de phosphore absorbent l'énergie émise par la radioactivité de l'échantillon et ensuite ré-émettent cette énergie en lumière bleue par excitation avec une lumière rouge. L'écran est ensuite scanné quelques minutes et une image des endroits et des intensités de la radioactivité des échantillons est obtenue. Une fois scannée, l'image peut être analysée grâce au software Packard's powerful OptiQuant. L'expression génique relative est déterminée par analyse des DLU (Digital Light Unit) en comparant l'expression du gène d'intérêt avec l'expression du gène 36B4 exprimé constitutivement dans les kératinocytes de manière à s'assurer du chargement homogène des ARNm poly(A) sur le gel et du transfert de ces ARNm poly(A) sur la membrane en nylon.

2.4. RT-PCR de la profilaggrine

2.4.1. Matériel

- Kit RT (GibcoBRL) : 5x First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl-pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), DTT 0,1 M, Oligo-dT 500 µg/ml, dNTP 10 mM, M-MLVRT(Moloney Murin Leukemia Virus Reverse Transcriptase) 200 unités/µl

- Mix RT (pour 20µl) : 0,1 µg ARNm poly(A) ou 1 µg ARN total, 1x First Strand Buffer, DTT 0,01 M, Oligo-dT 10 µg, dNTP 0,5 mM (de chaque), M-MLVRT(Moloney Murin Leukemia Virus Reverse Transcriptase) 100 unités.

- Kit PCR (GibcoBRL) : PCR Buffer 10x (200 mM Tris-HCl-pH 8.4, 500 mM KCl), dNTP 0,5 mM, MgCl₂ 50 mM, Taq DNA Polymerase 5 unités/µl.

- Mix PCR (pour 25µl) : cDNA fabriqué par RT, PCR Buffer 1x, dNTP 0,2 mM (de chaque), MgCl₂ 1,5 mM, primers 0,4 µM, Taq DNA Polymerase 0,625 unité

2.4.2. Méthode

La RT-PCR ou « Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction » est une PCR réalisée à partir d'ARNm poly(A) ou d'ARN total et permettant la transformation de ces ARN en cDNA simple brin par l'action d'une enzyme, la reverse transcriptase, et cet ADN produit servira de matrice pour une amplification. D'autres constituants sont indispensables pour le fonctionnement de la réaction, tels que les dNTP, les Oligo-dT, le DTT et des concentrations en sels optimales pour l'activation de l'enzyme.

Une fois les réactifs préparés, la transcription reverse peut commencer en incubant les échantillons dans le dispositif pour PCR (Perkin Elmer2400). La réaction se réalise à 37°C pendant 60 minutes.

L'amplification de l'ADN simple brin obtenu se réalise ensuite par la réaction en chaîne par la polymérase (PCR) en incubant 2µl des produits avec une ADN polymérase (Taq Polymerase), des dNTP, deux amorces oligonucléotidiques (figure M.II.) reconnaissant les limites du fragment d'ADN à amplifier et la concentration en sels est ajustée pour une réaction optimale.

Dans le dispositif pour PCR, une première incubation de 5 minutes à 94°C permet un désappariement total des hybrides ARN-cDNA les rendant disponibles pour les amorces. Une série de cycles seront ensuite réalisés (de 25 à 35 cycles selon le but recherché). Un cycle se compose de 3 températures : 94°C pendant 30 secondes permettant le désappariement total des hybrides ARN-cDNA ;

55°C pendant 30 secondes autorisant l'hybridation des amorces avec leur séquence complémentaire ;

72°C pendant 1 minute favorisant la synthèse de brins complémentaires par la Taq polymérase.

A la suite de ces cycles, une étape de 7 minutes à 72°C permet l'achèvement des brins éventuellement incomplets. Les échantillons peuvent ensuite être stockés à 4°C durant une période relativement longue (plusieurs mois), ou déposés sur gel d'agarose 2% (Bio-Rad) (figure M.III.) contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. Dans ce dernier cas, les fragments d'ADN sont extraits du gel après leur migration et purifiés à l'aide du kit Nucléotrap (Macherey Nagel). L'ADN purifié pourra alors être utilisé comme sonde pour l'hybridation de Northern blots.

3. Analyse des protéines

3.1. Marquage en immunofluorescence

3.1.1. Matériel

PBS :

- KCl 2,7 mM
- KH_2PO_4 15 mM
- NaCl 140 mM
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8,1 mM
- pH 7.4

PBS/BSA :

- PBS
- BSA (Bovine Albumine Serum – Fraction V) (SIGMA)
- 1% (saturation)
- 0,1% (rinçages)

Glycine :

- Glycine 0,1 M
- PBS

3.1.2. Méthode

Afin d'observer l'expression et la localisation des protéines des kératinocytes en suspension, quelques μl de cellules ont été prélevés des cultures et déposés sur lames Superfrost traitées à la L-polylysine (0,1 mg/ml) durant 1 heure. Les cellules sont perméabilisées 10 minutes dans le méthanol à -20°C , puis rincées dans le PBS et fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4%/PBS pendant 10 minutes. Après fixation, les aldéhydes sont bloqués par 3 rinçages de 5 minutes à la glycine.

Une étape de saturation des sites est requise dans le but d'éviter les fixations non spécifiques des anticorps secondaires. Cette saturation se réalise dans une solution de PBS/BSA 1% durant 2x15 minutes.

Les anticorps primaires et secondaires utilisés ainsi que leurs dilutions sont repris dans le tableau M.IV. Ces dilutions s'effectuent dans la solution de PBS/BSA 1% et l'incubation des anticorps primaires se réalise dans une chambre humide à température ambiante pendant 1 heure. Après réaction avec les anticorps primaires, les cellules sont rincées 3x5 minutes dans une solution de PBS/BSA 0,1%, puis incubées avec les anticorps secondaires couplés à la fluorescéine (FITC) dans des conditions identiques. Les cellules sont de nouveau rincées 3x5 minutes dans la solution de PBS/BSA 0,1% et les lames sont montées à l'aide de glycerol. Les marquages sont observés et photographiés sous microscopie en épifluorescence et les kératinocytes sont localisés et photographiés sous microscopie en contraste interférentiel différentiel (DIC).

| Anticorps | Dilution | Source | Spécificité |
|---|----------|--------------------------------|--------------------------------|
| DE-K10 (Prosan) | 1 : 50 | IgG monoclonal de souris | Cytokératine 10 de 56,6 kDa |
| HER1 (Biosource) | 1 : 25 | IgG monoclonal de souris | HER1(EGFR) |
| HER2 (Neomarkers) | 1 : 25 | IgG monoclonal de souris | HER2 |
| Filaggrine (Biomedical Technologies Inc.) | 1 : 200 | IgG monoclonal de souris | Grains de kératohyaline |
| Involucrine (Harbor) | 1 : 20 | IgG polyclonal de lapin | Involucrine |
| Ac 2aire-anti lapin-FITC (P.A.R.I.S.) | 1 : 1000 | IgG Polyclonal de chèvre | IgG de lapin |
| Ac 2aire-anti souris-FITC (P.A.R.I.S.) | 1 : 1000 | IgG Polyclonal de chèvre | IgG de souris |

Tableau M.IV. : anticorps utilisés en immunofluorescence

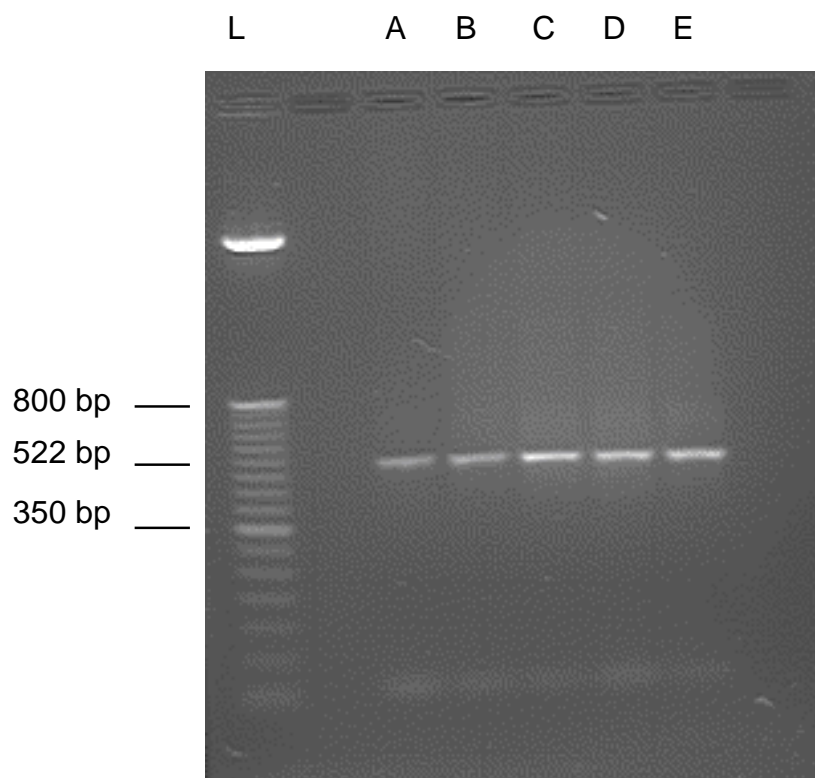


Figure M.III. : détection de la profilaggrine par RT-PCR. A : ARNm poly(A) extraits d'une culture autocrine sous-confluente. B : ARNm poly(A) extraits d'une culture autocrine confluente. C : ARNm poly(A) extraits d'une culture autocrine post-confluente. D et E : ARNtotal de peau complète.

| Sondes cDNA | Taille | Plasmide | Source | Sites de restriction | Référence |
|--------------------|---------------|-----------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| HER 1 | 887 bp | pGem-7 | Dr. Coffey Nashville | EcoRI | Jorissen et al., 2003 |
| HER 2 | 2900 bp | pCHC6 | Dr. Kern Georgetown | Xba I-Kpn I | Yamamoto et al., 1986 |
| HER 3 | 1376 bp | pTZ19U | Dr. Coffey Nashville | Eco RI-Hind III | Kraus et al., 1989 |
| Involucrine | 852 bp | pSPORT | R. Eckert Cleveland | Pst I | Eckert et Green, 1986 |
| K 10 | 2039 bp | pGem-3 | D.Roop Houston | Pst I | Roop et al., 1988 |
| K 14 | * 250 bp | pGem-3 | D.Roop Houston | Bst XI-Eco RI | Roop et al., 1988 |
| α 6 | 680 bp | PUC 18 | A.Sonnenberg Amsterdam | Eco RI | Hogervorst et al., 1993 |
| 36B4 | 700 bp | pGem-4 | J. Schalkwijk Nijmegen | Pst I | J. Laborda, 1991 |

Tableau M.I. Sondes utilisées pour l'hybridation des Northern blot.* : la restriction du plasmide contenant le fragment K14 par les enzymes décrites dans le tableau nous donne deux fragments. Le plus petit (250 bp) correspond à une région non codante de l'ADN.

| Nom | Primer sens | Primer anti-sens | Taille de l'amplicon |
|---------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Profilaggrine | AGCACTCATGAACAGTCTGA | ATGATGGTTTCTGGAAGCAG | 522 bp |

Tableau M.II : paire de primers utilisée (5'→3') dans la RT-PCR.

3.2. Western blot

3.2.1. Matériel

Tampon de lyse :

- Tris HCl 62,5 mM
- SDS (sodium dodecyl sulfate) 2%
- Glycérol 8,7%
- DTT 0,2 M
- Bleu de bromophénol 0,05%

Running buffer (pour 1l) :

- Tris base 25 mM
- Glycine 192 mM
- SDS (sodium dodecyl sulfate) 0,1%

Running gel 10% (pour 10ml) :

- Tris HCl 375 mM, pH 8.8
- SDS (sodium dodecyl sulfate) 0,1%

- Acrylamide/Bisacrylamide 10%
- APS (persulfate d'ammonium) 0,05%
- TEMED 0,05%

Stacking gel 4% (pour 5ml) :

- Tris HCl 125 mM, pH 6.8
- SDS (sodium dodecyl sulfate) 0,1%
- Acrylamide/Bisacrylamide 4%
- APS (persulfate d'ammonium) 0,05%
- TEMED 0,1%

Tampon de transfert (pour 1l) :

- Tris base 25 mM
- Glycine 192 mM
- Méthanol 20%

3.2.2. Méthode

Les kératinocytes confluents en culture autocrine sont lysés dans un petit volume de tampon de lyse 2x concentré (150µl pour les boîtes de pétri de 6cm) et les kératinocytes en suspension sont centrifugés à 1000 RPM pendant 10 minutes à 4°C, puis recevront également le tampon de lyse 2x concentré (500µl pour les boîtes de pétri de 10cm de diamètre).

Le lysat est mis à bouillir 5 minutes avant la séparation d'une quantité équivalente de protéines sur gel SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) 10% pour la détection des protéines involucrine, kératine 10, filaggrine et 7,5% pour la détection de la phosphorylation des résidus tyrosine des récepteurs HER1 et HER2.

L'électrophorèse PAGE s'effectue en présence d'un détergent, le sodium dodecyl sulfate (SDS), qui se fixe sur les protéines. C'est la répulsion électrostatique entre les molécules de SDS fixées qui provoque le dépliement des protéines. Puisque toutes les protéines sont recouvertes de charges négatives, la séparation de ces protéines se base sur une seule propriété, leur dimension qui est directement liée à leur poids moléculaire.

La migration électrophorétique s'effectue à 100 volts pendant 1 heure, après quoi le courant est coupé et le système est démonté. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF 0,45 µm (Amersham) par un autre traitement électrophorétique faisant sortir les protéines du gel. Ce transfert de protéines se réalise en immersion à 4°C sous un voltage de 60 volts durant 3 heures dans le dispositif prévu (Bio-Rad). Cette technique va permettre l'identification des protéines par leur interaction avec des anticorps spécifiques.

Afin d'éviter les fixations non spécifiques des anticorps secondaires, une saturation des sites dans une solution de PBS/0,1% Tween-20/5% lait écrémé (solution bloquante) 1 heure à température ambiante est requise avant l'incubation des protéines avec l'anticorps primaire d'intérêt (tableau M.V.) dilué dans la solution bloquante. Trois lavages de 5 minutes par une solution de PBS/0,1% Tween-20 (solution de rinçage) éliminant l'excès d'anticorps primaires sont réalisés avant l'incubation des protéines avec l'anticorps secondaire, couplé à la horse radish peroxidase (HRP) (tableau M.V.), dans des conditions identiques.

La révélation, après 3 lavages de 5 minutes par la solution de rinçage éliminant l'excès d'anticorps secondaire, se réalise par chémoluminescence (kit ECL, Amersham).

Après chaque révélation, les anticorps sont décrochés de la membrane par incubation dans une solution de glycine 0,1 M, pH 2,7.

| Anticorps | Dilution | Source | Spécificité |
|---|-----------------|----------------------|--|
| Filaggrine (Biomedical Technologies Inc.) | 1 : 200 | Monoclonal de souris | - Filaggrine (Doublet de 38 kDa) - Profilaggrine (400 kDa) |
| Erk (Upstate Biotechnology) | 1 : 10000 | Polyclonal de lapin | -Erk1(44 kDa) -Erk2(42 kDa) |
| Erk (Upstate Biotechnology) | 1 : 1000 | Monoclonal de souris | -Erk1 phosphorylé (44 kDa) -Erk2 phosphorylé (42 kDa) |
| HER1 (Upstate Biotechnology) | 1 : 250 | Polyclonal de lapin | Résidu tyrosine phosphorylé du récepteur HER1(EGFR) |
| HER1 (Biosource) | 1 : 250 | Monoclonal de souris | HER1(EGFR) |
| HER2 (Upstate Biotechnology) | 1 : 750 | Polyclonal de lapin | Résidu tyrosine phosphorylé du récepteur HER2 |
| Involucrine (Harbor) | 1 : 500 | Polyclonal de lapin | Involucrine |
| DE-K10 (Prosan) | 1 : 500 | Monoclonal de souris | Cytokératine 10 de 56.6 kDa |
| Ac2 ^{aire} anti-lapin-HRP (Prosan) | 1 : 1000 | Polyclonal de chèvre | IgG de lapin |
| Ac2 ^{aire} anti-souris-HRP (Prosan) | 1 : 1000 | Polyclonal de chèvre | IgG de souris |

Tableau M.V. : anticorps utilisés pour l'immunodétection des protéines par Western blot.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Analyse des cultures autonomes adhérentes de kératinocytes épidermiques humains en présence ou non de facteurs de croissance (EGF, HRG α ou HRG β)

L'ensemencement des kératinocytes épidermiques se réalise à une densité variant entre 5000 et 10000 cellules/cm² en présence de milieu complet (KGM-2) apportant tous les facteurs nécessaires à la prolifération des cellules. Le jour suivant, le milieu de culture est ôté, puis remplacé par le milieu complet Epilife favorisant la prolifération cellulaire notamment par une concentration en calcium peu élevée (0,06 mM). En effet, la concentration extracellulaire de calcium joue un rôle important dans la régulation de la prolifération du kératinocyte (Eckert et al., 1997). Une concentration faible en calcium empêche la formation des desmosomes (Hennings et al., 1980), ce qui retarde la différenciation (Yuspa et al., 1981 ; Tsao et al., 1982), une concentration plus élevée en calcium produit l'effet inverse.

Lorsque les cellules recouvrent environ 50% de la surface de la boîte de culture, les facteurs autocrines produits par les kératinocytes deviennent suffisants pour maintenir la prolifération cellulaire en absence de peptides exogènes. La culture se poursuit alors en milieu autocrine. A ce stade de sous-confluence, les kératinocytes se caractérisent par une prolifération importante se traduisant par la présence de nombreuses mitoses. Les cellules présentent une forme allongée et aux contours réfringents (figure R.1.A.).

La confluence, quant à elle, est atteinte lorsque les kératinocytes occupent l'entièreté de la surface de la boîte de culture. Les cellules cessent alors de se diviser (Wille et al., 1984), se serrent les unes contre les autres, prennent une forme polyédrique et leurs pourtours apparaissent moins réfringents (figure R.1.B.).

Il est à noter que l'utilisation du milieu de culture Epilife ne rend pas aisée l'identification d'une culture confluite. Un nombre non négligeable de divisions cellulaires est encore observé alors que la confluence de la culture est atteinte. Le développement de cellules larges semble aussi une conséquence de l'utilisation de ce milieu.

Une incubation de ces cultures confluentes en présence d'EGF (10 ng/ml) pendant 24 heures laisse apparaître un plus grand nombre de cellules de forme plus effilée, suggérant une capacité de migration des kératinocytes (figure R.1.C.). En effet, les facteurs de la famille de l'EGF sont impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes, mais aussi dans le contrôle de leur migration (Woodley, 1996 ; Wells, 2000). Par contre, lorsque les kératinocytes confluent sont incubés en présence des isoformes α ou β de l'HRG (10 ng/ml) dans des conditions identiques, aucune différence morphologique cellulaire majeure n'est observée par rapport aux cultures non traitées (figure R.1.D et E.).

Les modifications morphologiques constatées résultent de l'état de différenciation des kératinocytes caractérisé par l'expression de marqueurs de différenciation.

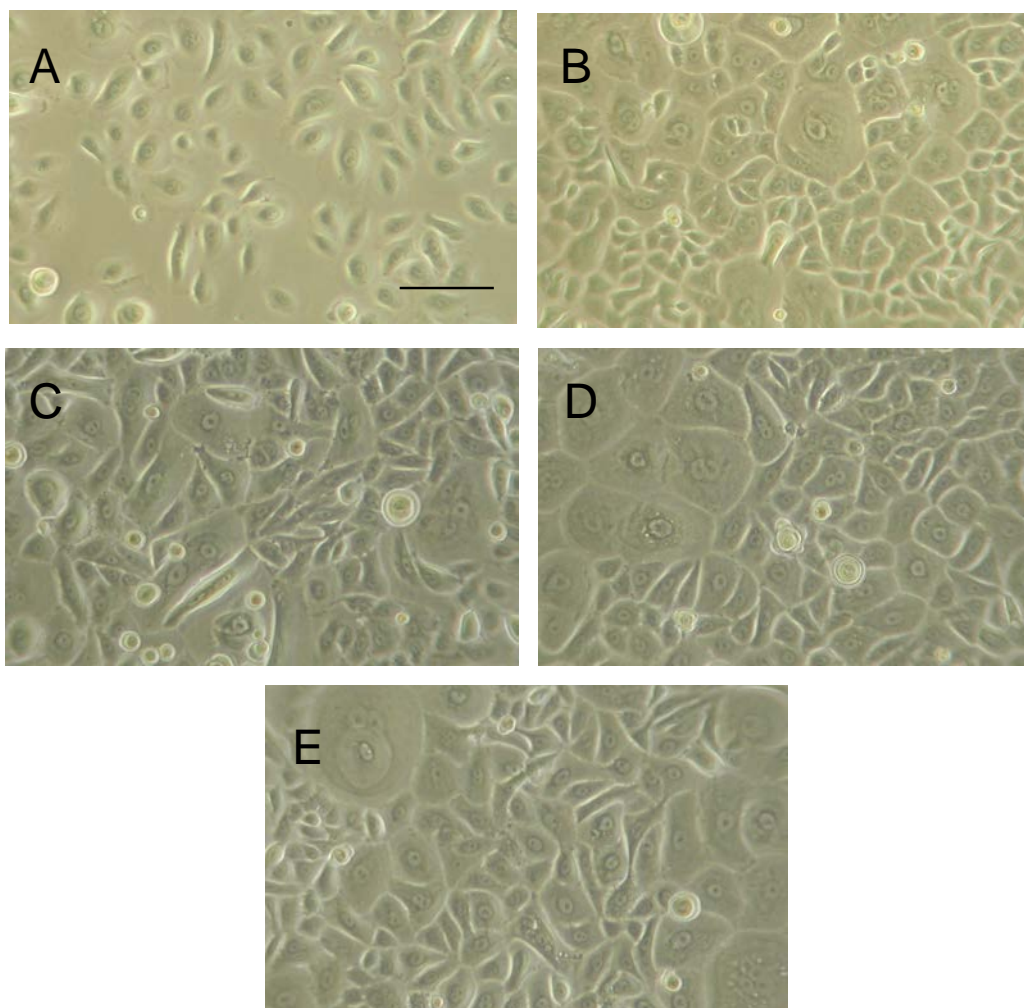


Figure R.1. : observation en microscopie à contraste de phase des cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains en milieu Epilife en présence ou non de facteurs de croissance (10 ng/ml) pendant 24 heures. A : culture sous-confluente : les kératinocytes prolifèrent. B : culture confluyente : les kératinocytes occupent l'entièreté de la boîte de culture. C : culture confluyente traitée en présence d'EGF. D : culture confluyente traitée en présence d'HRG α . E : culture confluyente traitée en présence d'HRG β . La barre d'échelle représente 100 μ m.

En culture autocrine, en absence de facteurs de croissance, les kératinocytes sous-confluents n'expriment pas la kératine 10. Son expression débute un jour après la confluence (figure R.2.). Marqueur de différenciation tardive, l'involucrine est pourtant faiblement exprimée un peu plus tôt que la kératine 10. A sous-confluence, l'expression de l'involucrine est déjà détectée (Poumay et al., 1999). Cependant, l'expression de l'involucrine n'est pas détectée dans notre culture autocrine confluyente mais est plutôt détectée 1 jour après la confluence, ce qui résulte peut-être de l'utilisation du milieu Epilife dans nos expériences.

La filaggrine constituant également un marqueur de différenciation tardive, n'est pas exprimée à confluence, ni 24 heures après la confluence. La kératine 14 quant à elle présente peu de variations de son expression que ce soit à confluence ou 1 jour après la confluence.

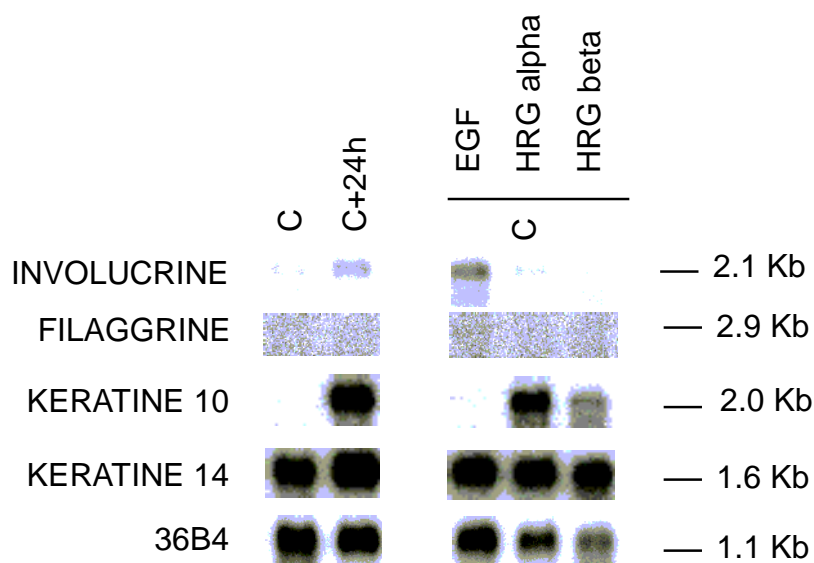


Figure R.2. : observation de l'expression des marqueurs de différenciation dans des cultures autocrines adhérentes confluentes (C) de kératinocytes épidermiques humains en présence ou non de facteurs de croissance (10 ng/ml) pendant 24 heures. Les échantillons (1,8 µg) ont été analysés par Northern blot en hybridant la même membrane avec des sondes spécifiques pour les kératines 10 et 14, la filaggrine, l'involucrine et la protéine ribosomiale 36B4. Chaque hybridation a été réalisée après décrochage de la sonde précédente.

La présence d'EGF (10 ng/ml) dans le milieu de culture autocrine des kératinocytes épidermiques durant 24 heures réprime complètement l'expression de la kératine 10 (figure R.2.). A cette répression d'expression de la kératine 10 se superpose une légère augmentation de l'expression de l'involucrine. L'expression de la kératine 14 ne semble pas altérée de façon significative par le traitement à l'EGF. Bien que favorisant l'expression de l'involucrine, l'ajout d'EGF à la culture n'induit pas l'expression de la filaggrine. En tant que mitogène, l'EGF devrait favoriser la prolifération et inhiber la différenciation cellulaire en réprimant l'expression des marqueurs de différenciation. Or, nos résultats suggèrent qu'en fonction du degré de différenciation des cellules, l'ajout d'EGF favoriserait soit la prolifération, soit la différenciation des kératinocytes. De plus, nous savons que dans les cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains, il existe de façon concomitante des cellules non différenciées et des cellules différenciées peut-être minoritaires mais exprimant fortement les marqueurs de différenciation (Poumay et Pittelkow, 1995).

La présence d'HRG α ou β (10 ng/ml) dans le milieu de culture autocrine des kératinocytes épidermiques durant 24 heures réduit l'expression de la kératine 10 et de l'involucrine (figure R.2.) suggérant un maintien de la faible différenciation des kératinocytes. En effet, l'HRG imite l'EGF dans sa capacité de retarder la mise en place du processus de différenciation initié normalement par les kératinocytes lors de l'augmentation de la densité cellulaire des cultures autocrines (De Potter et al., 2001).

2. La mise en suspension des kératinocytes épidermiques humains favorise leur différenciation cellulaire

Dans un épiderme normal, la prolifération des kératinocytes se limite à la couche basale au niveau de laquelle les kératinocytes adhèrent à leur matrice extracellulaire. Lorsque les kératinocytes quittent la couche basale pour rejoindre les couches suprabasales, ils cessent de proliférer et amorcent leur processus de différenciation caractérisé par l'expression de marqueurs de différenciation tout d'abord précoces, puis tardifs.

Pour se rendre compte des effets biologiques que peut avoir la mise en suspension sur la différenciation cellulaire, des kératinocytes sous-confluents sont cultivés en suspension par l'utilisation du poly-HEMA, lequel empêche les kératinocytes d'adhérer à une matrice extracellulaire. La sous-confluence des kératinocytes utilisés pour l'ensemencement en suspension est un point important afin de visualiser l'effet de la suspension sur la différenciation cellulaire. Pour ce faire, les kératinocytes sont préparés pour la suspension cellulaire par détachement à l'aide d'une solution de trypsine/EDTA des cellules sous-confluents. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du milieu autocrine et ensemencées sur poly-HEMA pour être cultivées en suspension.

Après 24 heures de culture en suspension, les kératinocytes interagissent les uns avec les autres et forment de larges agrégats de cellules plutôt arrondies (figure R.3.).

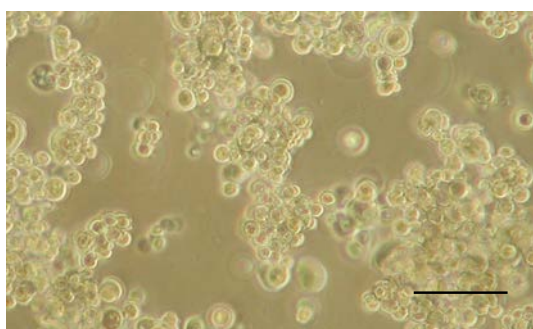


Figure R.3. : observation sous microscopie à contraste de phase des cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains en milieu Epilife après 24 heures de suspension. La barre d'échelle représente 100 μ m.

La morphologie et le comportement des cellules en suspension ayant été examinés, nous nous sommes demandés ce qu'il en était de l'expression des marqueurs de différenciation par extraction des ARNm poly(A) après 24 heures de suspension des kératinocytes épidermiques sous-confluents (figure R.4.). La sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ est exprimée fortement par les kératinocytes de la culture adhérente sous-confluente par rapport à la culture en suspension suggérant que la mise en suspension des kératinocytes réduit l'expression de cette sous-unité d'intégrine. Cette observation n'est pas vraiment étonnante quand on sait que l'expression des molécules d'intégrines se confine principalement à la couche cellulaire basale de l'épiderme et assurent notamment un rôle d'ancrage des cellules à leur matrice extracellulaire (Watt, 2002). On comprend dès lors que les kératinocytes en suspension, n'ayant plus de possibilités d'ancrage à un support, réduisent l'expression des molécules d'intégrines et plus particulièrement la sous-unité $\alpha 6$. Il a aussi été démontré que l'attache à la matrice extracellulaire par certaines intégrines inhibait la différenciation des kératinocytes (Watt, 2002). La kératine 14 voit également son expression diminuer par la mise

en suspension des cellules. Sachant que ce marqueur est exprimé au niveau de la couche basale de l'épiderme, que son association avec une autre kératine (kératine 5) suivie d'une polymérisation de cet hétérodimère en filaments intermédiaires assure une cohésion intercellulaire, ainsi qu'une adhésion à la matrice extracellulaire, il n'est pas surprenant que les kératinocytes en suspension réduisent l'expression de cette kératine puisqu'ils n'adhèrent plus à leur matrice extracellulaire. La kératine 10, marqueur de différenciation précoce exprimé par les kératinocytes en différenciation des couches suprabasales, n'est que peu détectée dans la culture adhérente sous-confluente et voit son expression augmentée par la suspension. Ce caractère de différenciation précoce se superpose cependant à une induction de l'expression de la filaggrine et à une augmentation forte de l'expression de l'involucrine, toutes les deux étant des marqueurs de différenciation tardive, suggérant que la perte d'attache à une matrice extracellulaire pendant 24 heures déclenche la différenciation terminale tardive des kératinocytes épidermiques, alors que la confluence déclenche surtout la différenciation précoce.

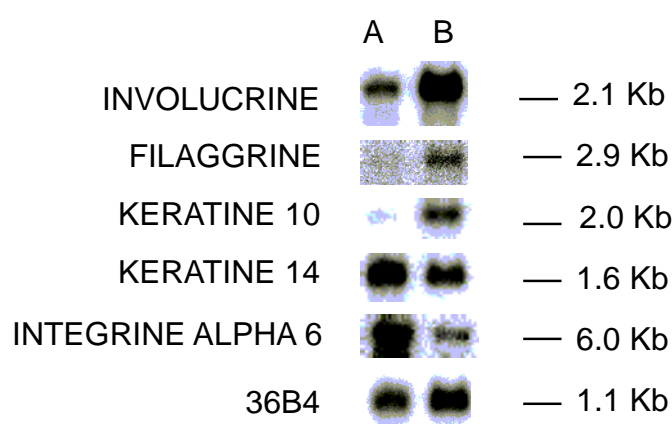


Figure R.4. : effet de la mise en suspension 24 heures sur l'expression de marqueur de cellules basales (sous-unité d'intégrine $\alpha 6$), de marqueur de cellules non différenciées (K14), de marqueur de différenciation précoce (K10) et de marqueurs de différenciation tardive (filaggrine et involucrine) dans des cultures autocrines de kératinocytes épidermiques. A : culture adhérente sous-confluente. B : culture en suspension 24 heures. Les échantillons (1,8 μ g) ont été analysés par Northern blot en hybridant la même membrane avec des sondes spécifiques pour la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$, les kératines 10 et 14, la filaggrine, l'involucrine et la protéine ribosomiale 36B4. Chaque hybridation a été réalisée après décrochage de la sonde précédente.

Afin de s'assurer que les variations d'expression des messagers codant pour la kératine 10 et l'involucrine se traduisent par des régulations de l'expression des protéines, une détection de ces protéines a été réalisée par Western blot. Les échantillons analysés sont des extraits de protéines provenant de cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains sous-confluents adhérents et de kératinocytes épidermiques humains sous-confluents placés en suspension pendant 24 heures. Parallèlement à l'augmentation d'expression des messagers codant pour la kératine 10 suite au passage en suspension pendant 24 heures, l'expression protéique de la kératine 10 augmente aussi dans ces conditions de suspension des kératinocytes épidermiques sous-confluents (figure R.5a.). Cependant, une augmentation d'expression des messagers codant pour l'involucrine ne semble pas liée à une augmentation de l'expression protéique de l'involucrine (figure R.5b.). En effet, l'expression de la protéine involucrine est comparable dans la culture autocrine adhérente sous-confluente et dans la culture autocrine sous-confluente placée en suspension pour 24 heures.

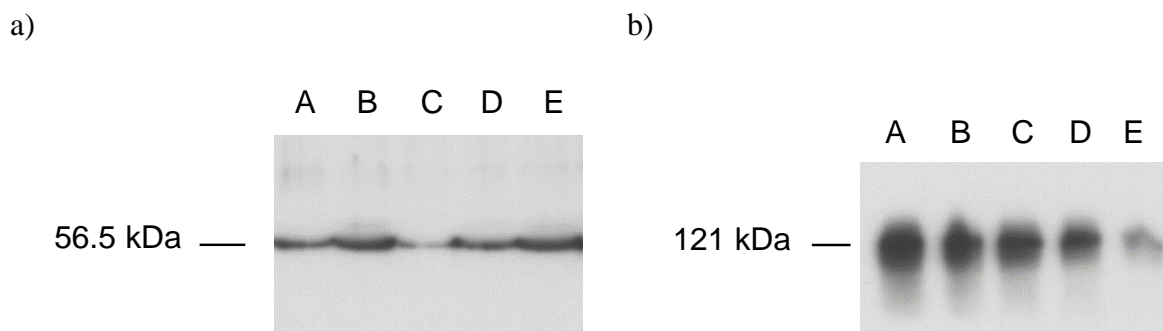


Figure R.5.: analyse de l'expression des marqueurs de différenciation (involucrine et kératine10) dans des cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains traités ou non en présence de facteurs de croissance (10 ng/ml) durant 24 heures . A : culture autocrine adhérente sous-confluente. B : culture autocrine sous-confluente placée en suspension 24 heures. C : culture autocrine sous-confluente placée 24 heures en suspension et traitée en présence d'EGF. D : culture autocrine sous-confluente placée 24 heures en suspension et traitée en présence d'HRG α . E : culture autocrine adhérente placée 24 heures en suspension et traitée en présence d'HRG β . a) Analyse de l'expression de la kératine 10. Les échantillons (900 μ g) de protéines ont été analysés par Western blot en détectant les kératines 10 de la façon décrite dans le tableau M.V. de la section Matériel et Méthodes. b) Analyse de l'expression de l'involucrine. Les échantillons (200 μ g) de protéines ont été analysés par Western blot en détectant l'involucrine de la façon décrite dans le tableau M.V. de la section Matériel et Méthodes.

En guise de résumé, nous pouvons affirmer que la perte d'attache à une matrice extracellulaire constitue un stimulus déclencheur du programme de différenciation épidermique par une augmentation de l'expression des marqueurs de différenciation précoces et tardifs.

3. Effet des facteurs de croissance de la famille de l'EGF et de l'HRG sur la différenciation induite par la mise en suspension pendant 24 heures des kératinocytes épidermiques humains

3.1. L'EGF favorise la différenciation épidermique amorcée par la mise en suspension pendant 24 heures

Les cultures autocrines sous-confluentes de kératinocytes épidermiques humains placées en suspension 24 heures, traitées en présence d'EGF (10 ng/ml) ne montrent pas de différence morphologique majeure avec les cultures autocrines cultivées en suspension pendant 24 heures (figure R.3. et R.6.).

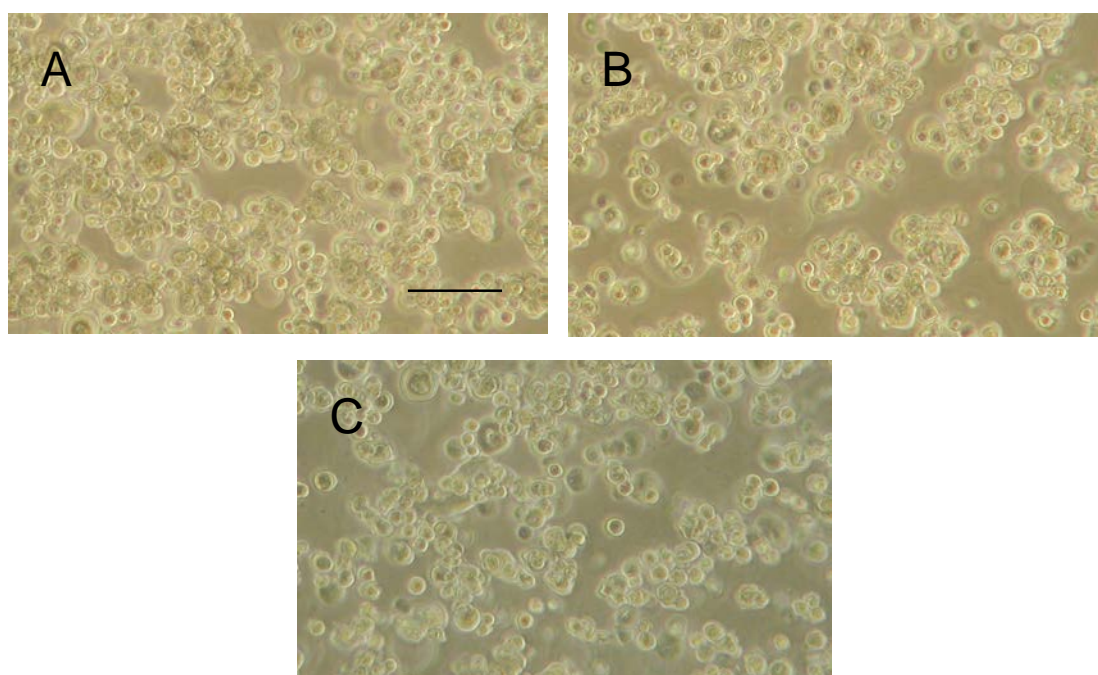


Figure R.6. : observation en microscopie à contraste de phase des cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains en milieu Epilife cultivés en suspension 24 heures et traités 24 heures en présence de facteurs de croissance (10 ng/ml). A : culture autocrine en présence d'EGF. B : culture autocrine en présence d'HRGα. C : culture autocrine en présence d'HRGβ. La barre d'échelle représente 100 μm.

Par contre, l'observation de l'expression des marqueurs de différenciation des kératinocytes épidermiques placés en suspension pendant 24 heures et traités avec l'EGF montre une réduction de l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ (figure R.7.). La kératine 14 ne voit pas son expression varier significativement par ajout d'EGF à l'opposé de la kératine 10 dont l'expression est diminuée par ce traitement. L'expression de la filaggrine n'est pas augmentée par la présence d'EGF, tandis que l'involucrine, elle, voit son expression augmenter. En comparant ces résultats avec ceux obtenus pour les cultures autocrines adhérentes confluentes (figure R.2.), le traitement par l'EGF (10 ng/ml) procure des effets similaires, si ce n'est dans les cultures autocrines en suspension, où l'EGF ne réprime pas

complètement l'expression de la kératine 10, indiquant peut-être une différenciation cellulaire plus avancée.

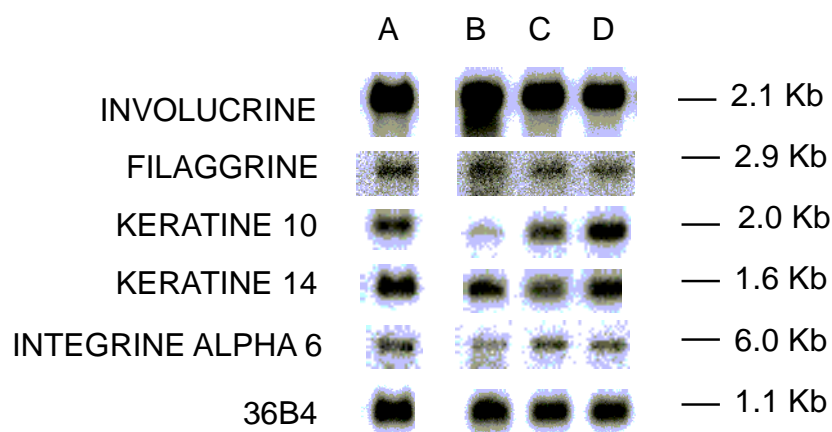


Figure R. 7. : observation de l'expression des marqueurs de différenciation dans des cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains cultivés 24 heures en suspension traités ou non 24 heures en présence de facteurs de croissance (10 ng/ml). A : culture autocrine non traitée. B : culture autocrine traitée en présence d'EGF. C : culture autocrine traitée en présence d'HRG α . D : culture autocrine traitée en présence d'HRG β . Les échantillons (1.8 μ g) ont été analysés par Northern blot en hybridant la même membrane avec des sondes spécifiques pour les kératines 10 et 14, la filaggrine, l'involucrine et la protéine ribosomiale 36B4. Chaque hybridation a été réalisée après décrochage de la sonde précédente.

Pour vérifier que les variations d'expression des messagers correspondent à des régulations d'expression protéiques, la détection des protéines kératine 10 et involucrine est réalisée par Western blot. Les échantillons analysés sont des extraits de protéines provenant de cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains placées en suspension 24 heures et traitées 24 heures en présence d'EGF (10 ng/ml). Il apparaît évident que l'ajout d'EGF réduit mais ne réprime pas complètement l'expression de la kératine 10 suggérant un effet pro-différenciateur de l'EGF lorsque les kératinocytes épidermiques ne possèdent plus d'attache à leur matrice extracellulaire (figure R.5a.). Par contre, l'expression de la protéine involucrine ne semble pas augmentée par le traitement à l'EGF (figure R.5b.).

Une analyse morphologique de l'expression des marqueurs de différenciation dans les cellules analysées individuellement a été ensuite réalisée par marquage en immunofluorescence des kératinocytes épidermiques humains après 24 heures de culture en suspension, traités ou non par l'EGF. La kératine 10 n'est que faiblement détectée dans les cultures autocrines de kératinocytes placées 24 heures en suspension et non traitées (figure R.8.A et B). Le traitement de ces cultures 24 heures en présence d'EGF réduit encore le nombre de cellules positives pour le marquage de la kératine 10 et l'observation en DIC indique que les cellules sont bien présentes mais que la majorité d'entre elles sont négatives pour le marquage (figure R.8.C et D).

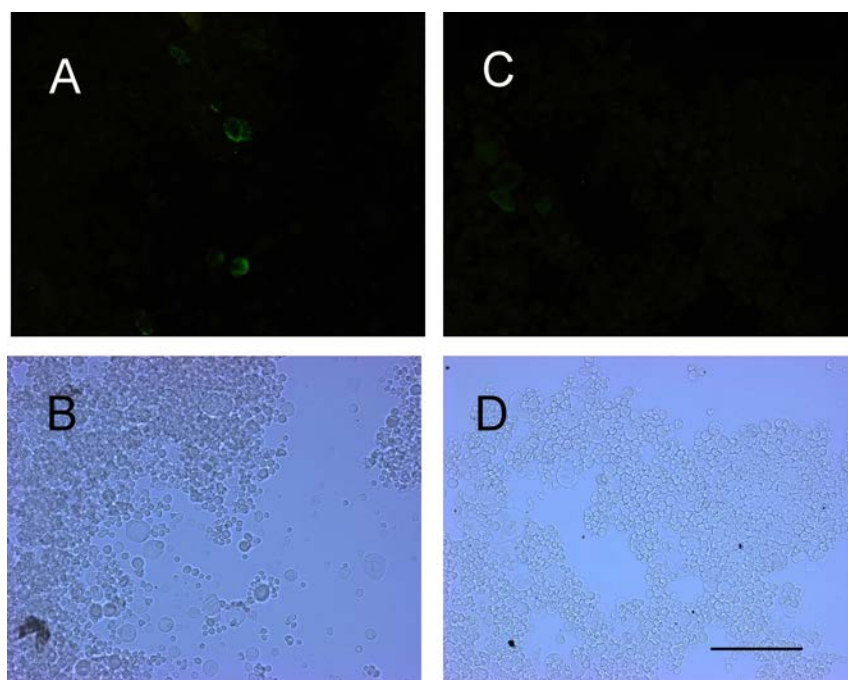


Figure R.8. : Expression de la kératine 10 dans des cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains cultivés 24 heures en suspension traités ou non en présence d'EGF (10 ng/ml) pendant 24 heures. A : culture autocrine non traitée observée en microscopie à fluorescence. B : culture autocrine (A) observée en microscopie DIC. C : culture autocrine traitée en présence d'EGF observée en microscopie à fluorescence. D : culture autocrine (C) observée en microscopie DIC. La barre d'échelle représente 400 µm.

Par contre, l'involucrine est déjà exprimée de façon non négligeable dans les cultures autocrines après 24 heures en suspension et non traitées, mais laisse apparaître un certain nombre de cellules négatives pour le marquage de l'involucrine (figure R.9.A et B). L'ajout d'EGF dans le milieu de ces cultures durant 24 heures montre une augmentation du nombre de cellules positives pour le marquage. (figure R.9.C et D).

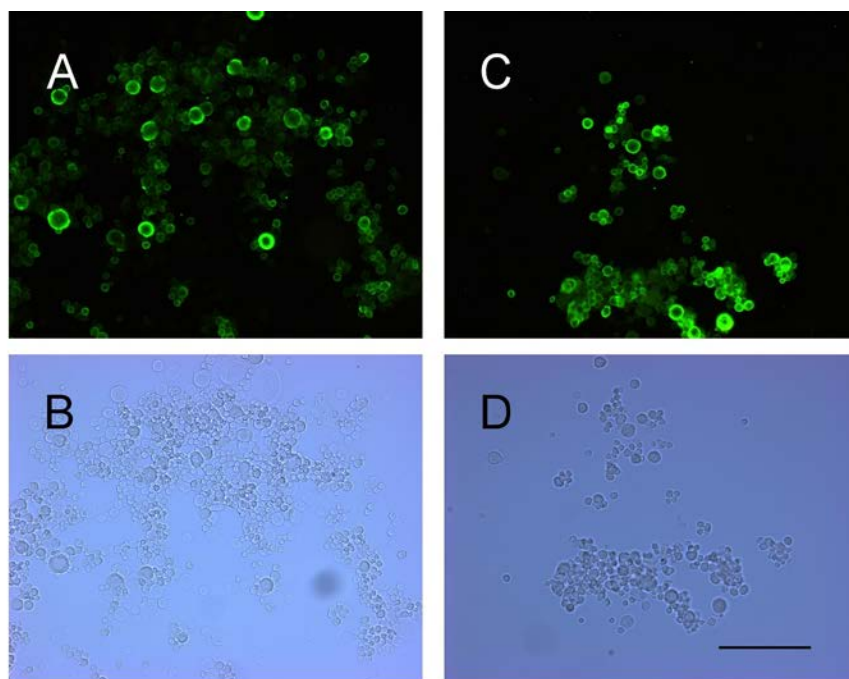


Figure R.9. : Expression de l'involucrine dans des cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains cultivés 24 heures en suspension traités ou non en présence d'EGF (10 ng/ml) durant 24 heures. A : culture autocrine non traitée observée en microscopie à fluorescence. B : culture autocrine (A) observée en microscopie DIC. C : culture autocrine traitée en présence d'EGF observée en microscopie à fluorescence. D : culture autocrine (C) observée en microscopie DIC. La barre d'échelle représente 400 μ m.

L'ensemble de ces résultats renforce l'hypothèse selon laquelle que l'EGF exerce un effet pro-différenciateur sur les kératinocytes épidermiques humains cultivés en suspension pendant 24 heures.

3.2. L'HRG n'affecte pas la différenciation épidermique induite par la mise en suspension 24 heures

Tout comme pour les kératinocytes cultivés en suspension pendant 24 heures et traités en présence d'EGF, la présence des isoformes α ou β de l'HRG dans le milieu de culture des kératinocytes épidermiques, dans des conditions identiques de culture en suspension, ne montre pas de modification morphologique significative avec les cultures autocrines non traitées (figure R.6.).

L'analyse de l'expression des marqueurs de différenciation par extraction des ARNm poly(A) de ces mêmes cultures placées en suspension et traitées par l'HRG pendant 24 heures ne nous apporte guère d'information, si ce n'est que l'HRG ne modifie en rien l'expression des messagers codant pour la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$, les kératines 10 et 14, la filaggrine et l'involucrine (figure R.7.).

La détection des protéines kératine 10 et involucrine a été réalisée par Western blot et montre une réduction assez drastique de l'expression de l'involucrine par traitement des

cultures autocrines 24 heures en suspension en présence d'HRG β (figure R.5b.). Par contre, l'expression de la kératine 10 ne semble pas être affectée par l'ajout d'HRG dans le milieu de culture autocrine des kératinocytes épidermiques en suspension (figure R.5a.).

L'absence de variations marquées de l'expression des marqueurs de différenciation des kératinocytes épidermiques humains placés en suspension et traités par l'HRG est assez étonnante quand on sait que les récepteurs de l'HRG et notamment HER2 et HER3 sont surtout exprimés par les cellules en différenciation (De Potter et al., 2001). Nous avons dès lors étudié ces récepteurs et leur activation dans nos conditions de culture.

4. Analyse de l'expression des récepteurs de la famille des HER

Pour essayer de mieux comprendre les effets des ligands EGF et HRG sur les kératinocytes en suspension, nous avons d'abord analysé l'expression des récepteurs de la famille des HER avant de rechercher leur activation éventuelle dans ces conditions de culture (cf. paragraphe 5).

4.1. Effet de la mise en suspension 24 heures sur l'expression des récepteurs de la famille des HER

L'hybridation du Northern blot avec une sonde spécifique du récepteur de l'EGF montre les deux bandes typiques à 10.0 et 5.6 kb (Clark et al., 1985). En comparant les deux conditions de culture, on peut voir que la mise en suspension 24 heures des kératinocytes épidermiques humains semble affecter l'expression du récepteur HER1 en la réduisant légèrement (figure R.10a). L'analyse densitométrique de la membrane de Northern blot suggère cette faible diminution d'expression pour les deux transcrits du récepteur HER1 (figure R.10b.) suite à la perte d'attache des kératinocytes épidermiques sous-confluents à une matrice extracellulaire. Cette diminution d'expression concorde avec la différenciation des cellules en suspension puisque le récepteur HER1 est exprimé préférentiellement par les cellules non ou peu différenciées de l'épiderme (Partridge et al., 1988; Damjanov et al., 1986; Kearsley et al., 1991).

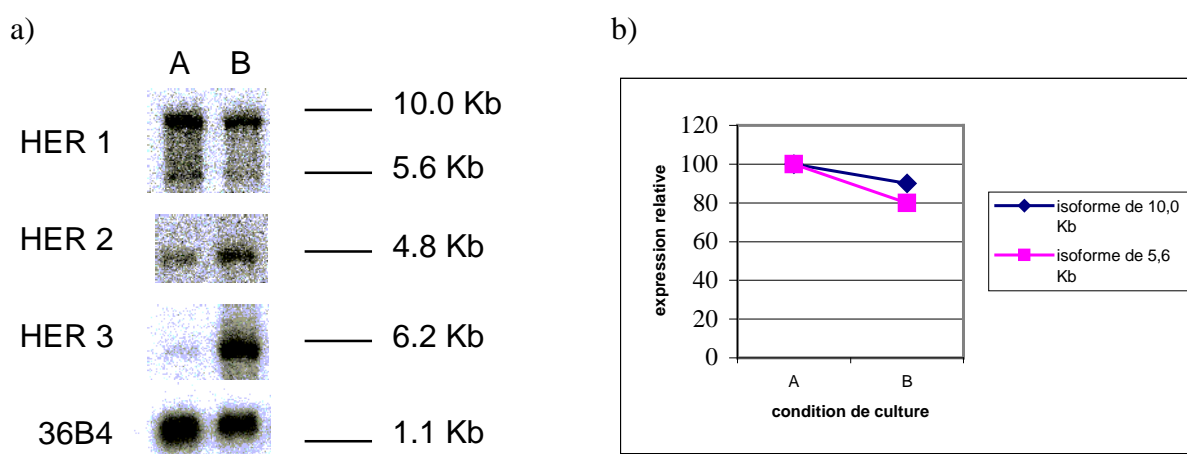


Figure R.10. : a) Effet de la mise en suspension sur l'expression des récepteurs de la famille des HER dans des cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains en milieu Epilife. A : culture autocrine sous-confluente adhérente. B : culture autocrine sous-confluente placée 24 heures en suspension. Les échantillons (1.8 μ g) ont été analysés par Northern blot

en hybridant la même membrane avec des sondes spécifiques pour les récepteurs HER1, HER2, HER3 et la protéine ribosomiale 36B4. Chaque hybridation a été réalisée après décrochage de la sonde précédente. b) Analyse densitométrique de l'expression des deux isoformes du récepteur HER1 suite au passage en suspension 24 heures des kératinocytes épidermiques humains en culture autocrine. A : culture autocrine sous-confluente adhérente. B : culture autocrine sous-confluente cultivée 24 heures en suspension. Les mesures densitométriques se réalisent par le rapport de l'expression de chaque isoforme du récepteur HER1 sur l'expression de la protéine ribosomiale 36B4 afin d'obtenir une expression relative qui est ensuite rapportée à la valeur déterminée en culture autocrine sous-confluente adhérente, choisie arbitrairement comme référence et dont la valeur est fixée à 100 % .

Les autres membres de la famille des récepteurs HER tels que HER2 et HER3 montrent une augmentation de leur expression par la mise en suspension des kératinocytes épidermiques sous-confluents (figure R.10a.). Ceci est en accord avec l'augmentation de l'expression des récepteurs HER2 et HER3 mesurée au cours d'une culture confluente et post-confluente (De Potter et al., 2001) qui, comme la mise en suspension des kératinocytes favorise la différenciation.

Nous ne disposons malheureusement pas dans le cadre de ce travail d'analyses de l'expression protéique de ces récepteurs afin de vérifier que les variations d'expression des messagers correspondent aussi à des régulations d'expression protéique de ces récepteurs. Nous pouvons cependant constater la variation d'expression des messagers nous indiquant que la mise en suspension pendant 24 heures réprime l'expression des récepteurs HER1 et favorise l'expression des récepteurs HER2 et HER3.

4.2. Effet de l'EGF sur l'expression des récepteurs de la famille des HER

L'ajout d'EGF (10 ng/ml) pendant 24 heures dans le milieu de culture autocrine des kératinocytes épidermiques sous-confluents placés en suspension 24 heures réduit de façon marquée l'expression de son récepteur HER1. Il s'agit probablement d'un phénomène de feed-back négatif par lequel la cellule diminue la transcription des séquences codantes pour le récepteur HER1 lorsque le ligand s'est lié à son récepteur. Plusieurs études ont démontré que le traitement à l'EGF de cellules tumorales du sein stimule à la fois l'expression des messagers et l'expression des protéines pour le récepteur à l'EGF (Chrysogelos et Dickson, 1994; Kudlow et al., 1986; Bjorge et Kudlow, 1987). En sachant que les cellules cancéreuses se divisent de façon anarchique, et que l'EGF constitue un agent mitogène puissant, il n'est peut-être pas surprenant d'observer une augmentation de l'expression du récepteur à l'EGF dans ces cellules cancéreuses. Par contre, nos kératinocytes épidermiques humains cultivés en suspension pendant 24 heures, amorcent alors leur processus de différenciation suggérant que l'action mitogène de l'EGF ne leur est plus nécessaire à ce stade et c'est peut-être pour cette raison que nous observons une quantité plus faible de récepteurs à l'EGF dans les cellules différenciées.

Ce traitement à l'EGF semble réduire également mais plus légèrement l'expression des récepteurs HER2 et HER3 (figure R.11a.). L'analyse densitométrique de la membrane de Northern blot montre cette diminution d'expression pour les récepteurs HER2 et HER3 (figure R.11b.). Le récepteur HER1 constituant le récepteur préféré des facteurs de croissance de la famille de l'EGF, il s'hétérodimérise avec HER2 ou HER3 en fonction de la disponibilité des récepteurs. Puisque HER2 n'a pas de ligand connu (Yarden et Sliwkowski, 2001) et que HER3 possède une activité tyrosine kinase déficiente, HER1 s'associe soit avec

HER2, soit avec HER3 en fonction du type de récepteur présent à ce moment (Yarden et Sliwkowski, 2001).

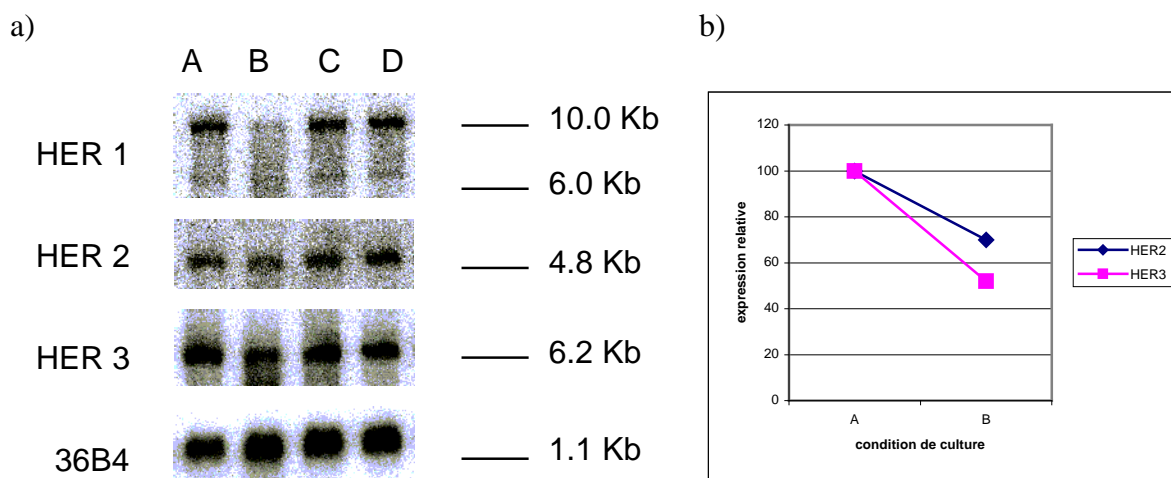


Figure R.11. : a) effet des facteurs de croissance (10 ng/ml) sur l'expression des récepteurs de la famille des HER dans des cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains sous-confluentes cultivés 24 heures en suspension. A : culture autocrine non traitée. B : culture autocrine traitée 24 heures en présence d'EGF. C : culture autocrine traitée 24 heures en présence d'HRG α . D : culture autocrine traitée 24 heures en présence d'HRG β . Les échantillons (1.8 μ g) ont été analysés par Northern blot en hybridant la même membrane avec des sondes spécifiques pour les récepteurs HER1, HER2, HER3 et la protéine ribosomiale 36B4. Chaque hybridation a été réalisée après décrochage de la sonde précédente. b) analyse densitométrique de l'expression des récepteurs HER2 et HER3 suite au traitement à l'EGF des kératinocytes épidermiques humains en culture autocrine en suspension depuis 24 heures. A : culture autocrine non traitée. B : culture autocrine traitée en présence d'EGF (10 ng/ml) durant 24 heures. Les mesures densitométriques se réalisent par le rapport de l'expression de chaque récepteur sur l'expression de la protéine ribosomiale 36B4 afin d'obtenir une expression relative qui est ensuite rapportée à la valeur déterminée en culture autocrine 24 heures en suspension non traitée, choisie arbitrairement comme référence et dont la valeur est fixée à 100 %.

4.3. Effet de l'HRG sur l'expression des récepteurs de la famille des HER

Le traitement des cultures autocrines 24 heures en suspension en présence des isoformes α ou β de l'HRG (10 ng/ml) pendant 24 heures ne semble pas affecter l'expression des récepteurs HER1, HER2 et HER3 (figure R.11a). L'absence de variation de l'expression du récepteur HER1 n'est pas étonnante car ce récepteur lie préférentiellement les facteurs de croissance de la famille de l'EGF, mais l'absence de variation de l'expression des récepteurs HER2 et HER3 est peut-être surprenante quand on sait que le récepteur hétérodimérique HER2 et HER3 constitue un récepteur à haute affinité pour l'HRG (Sliwkowski et al., 1994) qui peut être régulé suite à sa liaison à ce ligand.

Afin d'éclaircir ce point, nous avons étudié le système de signalisation impliquant les récepteurs HER2 et HER3 mais aussi HER1 en étudiant la phosphorylation des récepteurs HER1 et HER2.

5. Analyse de l'activation des récepteurs HER1 et HER2

Nombreuses sont les études qui ont démontré l'hétérodimérisation et l'activation par phosphorylation des résidus tyrosine des récepteurs HER1, HER2 et HER3 par le facteur de croissance EGF ou HRG (Carraway et al., 1995 ; Fiddes et al., 1995). Nous avons donc analysé l'activation d'un de ces récepteurs dans les kératinocytes épidermiques humains en culture autocrine en fonction de la mise en suspension et du traitement de ces kératinocytes.

Pour analyser l'activation des récepteurs HER1 et HER2, les kératinocytes épidermiques sous-confluent en culture autocrine sont tout d'abord placés 24 heures en suspension, puis traités ou non 20 minutes en présence des facteurs de croissance (10 ng/ml) EGF, HRG α ou HRG β .

5.1. Le récepteur HER1

La détection de l'activation du récepteur de l'EGF (HER1) par Western blot ne nous a pas procuré de résultats analysables. En effet, aucune phosphorylation de ce récepteur n'est détectée dans nos cultures en suspension pendant 24 heures traitées et non traitées par les ligands EGF et HRG. De plus, nous ne sommes pas arrivés à détecter les protéines HER1 totales dans ces mêmes cultures suggérant probablement un dépôt de protéines trop faible sur le gel d'électrophorèse et par là, l'impossibilité de détecter l'activation du récepteur. Ces expériences devront être recommencées.

5.2. Le récepteur HER2

5.2.1. La mise en suspension 24 heures favorise l'activation du récepteur HER2

A sous-confluence, les kératinocytes épidermiques adhérents n'exposent aucune phosphorylation du récepteur ni aucune phosphorylation de Erk (figure R.12.). Dans ces conditions de sous-confluence où le récepteur HER2 est faiblement exprimé par les kératinocytes, nous ne nous attendions pas à observer une phosphorylation de ce récepteur. Par contre, la perte d'attache à une matrice extracellulaire des kératinocytes épidermiques active le récepteur HER2 par sa phosphorylation et stimule faiblement la voie des Erk (figure R.12.). La mise en suspension favorisant la différenciation cellulaire, elle stimule l'expression des récepteurs HER2. On peut penser que si les récepteurs disponibles sont alors en nombre plus élevé, leur activation résulte peut-être des facteurs autocrines produits par les kératinocytes épidermiques.

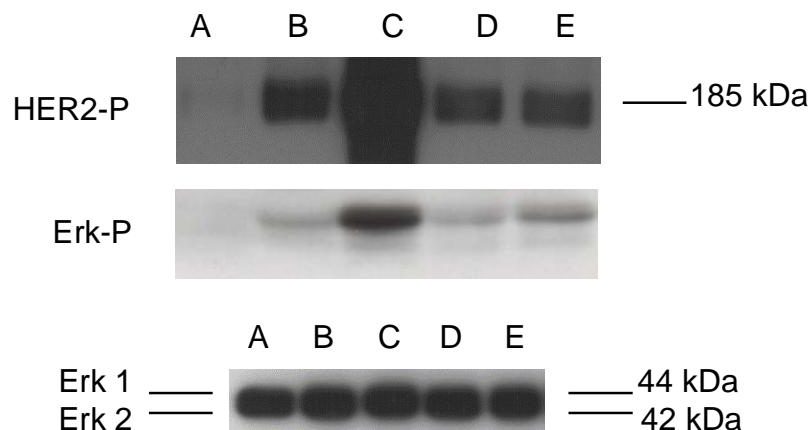


Figure R.12. : analyse de l'activation du récepteur HER2 et Erk par détection des résidus tyrosine phosphorylés dans des cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains traités 20 minutes ou non en présence de facteurs de croissance (10 ng/ml). A : culture autocrine sous-confluente adhérente. B : culture autocrine sous-confluente placée 24 heures en suspension. C : culture autocrine sous-confluente placée 24 heures en suspension et traitée en présence d'EGF. D : culture autocrine sous-confluente placée 24 heures en suspension et traitée en présence d'HRG α . E : culture autocrine sous-confluente placée 24 heures en suspension et traitée en présence d'HRG β . Après séparation des protéines par SDS-PAGE 7,5% et transfert sur une membrane PVDF, les protéines HER2 phosphorylées, Erk phosphorylées et Erk totales ont été détectées par Western blot avec un anticorps spécifique comme décrit dans le tableau M.IV., Matériel et Méthodes.

5.2.2. L'EGF est un activateur puissant du récepteur HER2

L'ajout d'EGF au milieu de culture des kératinocytes épidermiques en suspension depuis 24 heures augmente de façon drastique l'activation du récepteur HER2 (figure R.12.) par comparaison aux cultures autocrines en suspension non traitées. La stimulation de Erk est elle aussi plus importante par traitement à l'EGF. Ce résultat suggère que le récepteur HER2 jouerait donc un rôle important dans la réponse à l'EGF.

5.2.3. L'HRG n'active pas le récepteur HER2

Par contre, le traitement des cultures autocrines de kératinocytes épidermiques en suspension depuis 24 heures en présence des isoformes α ou β de l'HRG ne semble pas favoriser l'activation du récepteur HER2 par rapport à son activation basale dans les cultures autocrines non traitées (figure R.12.). Cependant, une légère augmentation de l'activation basale de Erk est détectée lorsque la culture autocrine en suspension est traitée avec l'isoforme β . Cette observation suggère que même si l'HRG n'active pas ou très peu le récepteur HER2, le facteur serait malgré tout capable de recruter des éléments de cette voie de transduction du signal. L'isoforme β de l'HRG activerait de façon plus intense la voie des Erk que l'isoforme α , ce qui n'est pas surprenant quand on sait que l'affinité de l'isoforme β pour son récepteur est 10 fois supérieure à celle de l'isoforme α (Wen et al., 1994).

En sachant que le récepteur HER2 s'hétérodimérise avec HER3 suite à une stimulation par l'HRG et que les deux récepteurs s'activent par phosphorylation, il serait nécessaire d'analyser l'activation du récepteur HER3 dans les mêmes conditions avant de pouvoir tirer des conclusions. Ces expériences restent à réaliser.

6. Localisation des récepteurs HER1 et HER2

Afin de répondre à l'interrogation posée par l'absence d'activation des récepteurs HER2 dans les kératinocytes épidermiques humains cultivés 24 heures en suspension et traités avec les isoformes α ou β de l'HRG, une localisation des récepteurs HER2 et HER1 a été réalisée. Les récepteurs HER1 semblent être localisés principalement sur la membrane des kératinocytes, tandis que les récepteurs HER2 seraient localisés plutôt dans le cytoplasme des kératinocytes (figure R.13.) (malgré un bruit de fond assez important : le stockage des cellules a probablement détérioré la structure membranaire des kératinocytes et serait la cause principale de ce bruit de fond). Nous pouvons tout de même émettre l'hypothèse selon laquelle le récepteur HER1, après activation par l'EGF, pourrait probablement se trouver

internalisé suite à un phénomène de désensibilisation et hétérodimérise avec le récepteur HER2 intracytoplasmique et l'active. Cette interprétation serait en accord d'une part avec les résultats obtenus lors de l'analyse de l'activation de ces récepteurs, et d'autre part avec les observations faites par Stoll et al. (2001).

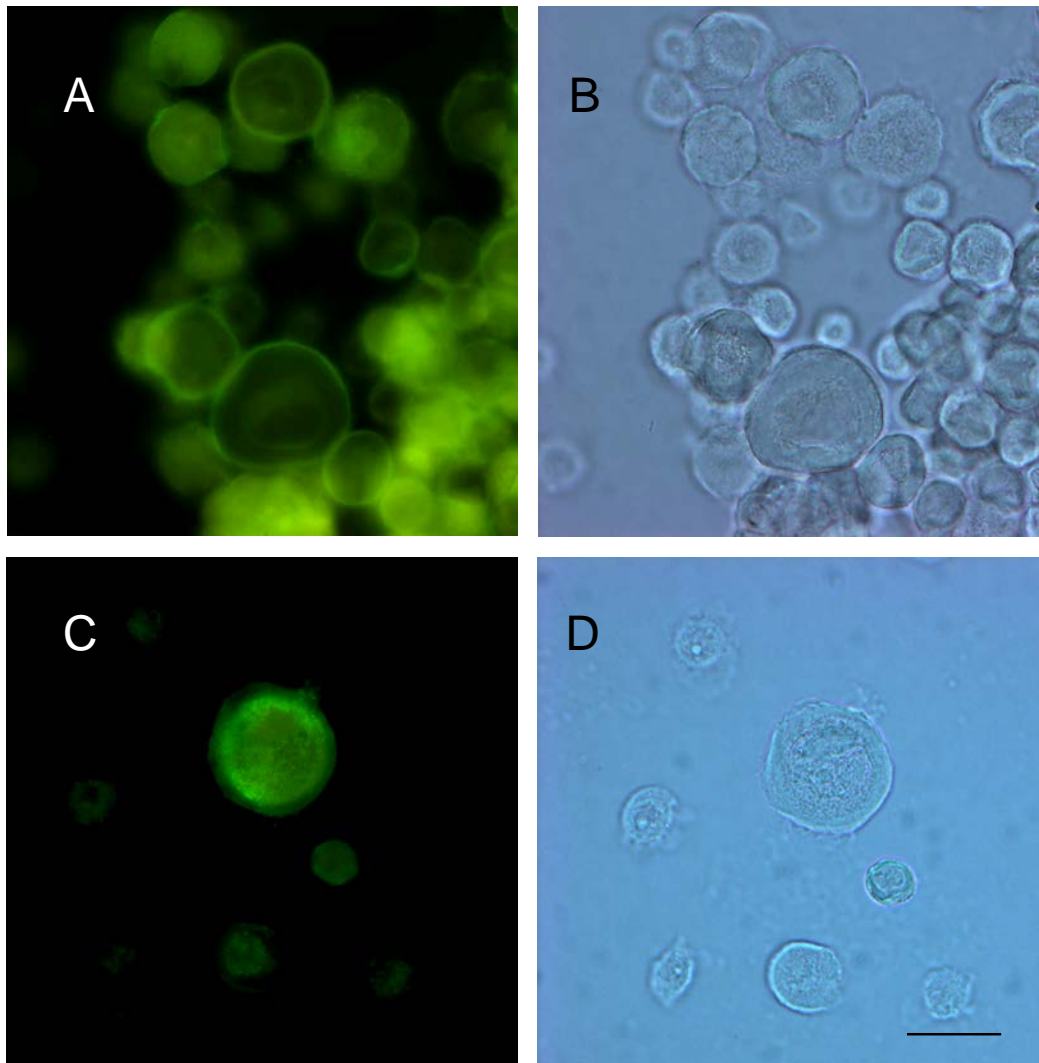


Figure R.13. : localisation des récepteurs HER1 et HER2 dans des cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains placées en suspension 24 heures. A : localisation de HER1 en microscopie à fluorescence. B : localisation de HER1 en microscopie DIC. C : localisation de HER2 en microscopie à fluorescence. D : localisation de HER2 en microscopie DIC. La barre d'échelle représente 100 μm .

7. Effet de la mise en suspension 48 heures des kératinocytes épidermiques humains sur leur différenciation.

La perte d'attache à une matrice extracellulaire durant 24 heures favorisait déjà de façon non négligeable la différenciation épidermique tardive. Nous nous sommes cependant demandés si la prolongation de la durée de suspension à 48 heures n'allait pas dévoiler des résultats plus démonstratifs encore. En effet, Wakita et Takigawa (1999) semblent avoir des effets plus probants après 48 heures de culture.

La morphologie des cultures autocrines de kératinocytes épidermiques sous-confluentes placés 48 heures en suspension ne montre pas de modification majeure avec les cultures autocrines ayant passé 24 heures en suspension (figure R.14.).

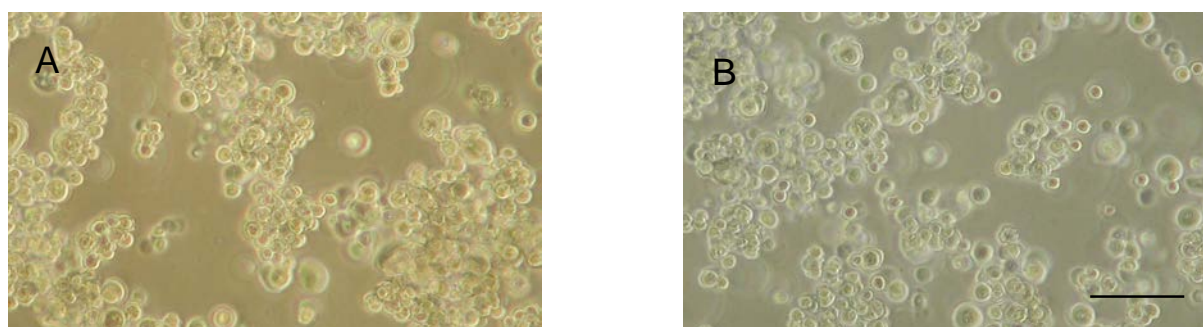


Figure R.14. : observation sous microscopie à contraste de phase des cultures autocrines de kératinocytes épidermiques humains en milieu Epilife. A : culture autocrine placée en suspension pendant 24 heures. B : culture autocrine placée en suspension pendant 48 heures. La barre d'échelle représente 100 µm.

L'analyse de l'expression des marqueurs de différenciation des kératinocytes épidermiques ayant passé 48 heures en suspension a été réalisée par extraction des ARNm poly(A). Dans la culture autocrine adhérente sous-confluente, ni la kératine 10, ni l'involucrine n'est détectée (figure R.15.). Par contre, la kératine 14 et la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ sont exprimées par les kératinocytes sous-confluentes. La mise en suspension pendant 24 heures de ces kératinocytes montre une induction de l'expression de la kératine 10 et de l'involucrine, ainsi qu'une réduction de l'expression de la kératine 14 et de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ et ceci malgré un dépôt d'ARNm poly(A) plus important. Ces résultats suggèrent que la mise en suspension des kératinocytes épidermiques induit de façon marquée leur différenciation, et sont en accord avec ce qui a été constaté précédemment. Après 48 heures de suspension, l'expression de la kératine 10 et de l'involucrine est encore augmentée, tandis que l'expression de la kératine 14 et de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$ est réduite de façon drastique (figure R.15.) suggérant une différenciation plus importante des kératinocytes et surtout la perte du phénotype basal. En effet, après 48 heures en suspension, les kératinocytes épidermiques n'expriment pratiquement plus les marqueurs kératine 14 et sous-unité d'intégrine $\alpha 6$.

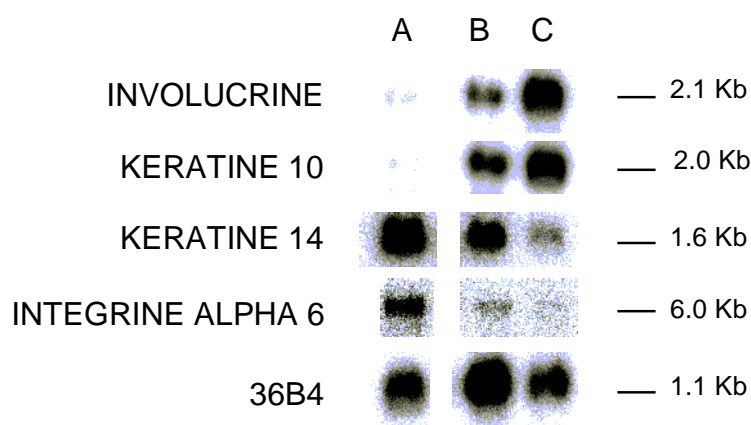


Figure R.15. : Effet de la mise en suspension sur l'expression de marqueur de cellules basales (sous-unité d'intégrine $\alpha 6$), de marqueur de cellules non différenciées (K14), de marqueur de

cellules en différenciation précoce (K10) et de marqueur de cellules en différenciation tardive dans des culture autocrines de kératinocytes épidermiques. A : culture adhérente sous-confluente. B : culture en suspension 24 heures. C : culture en suspension 48 heures. Les échantillons (2 µg) ont été analysés par Northern blot en hybridant la même membrane avec des sondes spécifiques pour la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$, les kératine 10 et 14, l'involucrine et la protéine ribosomiale 36B4. Chaque hybridation a été réalisée après décrochage de la sonde précédente.

Ces résultats obtenus tardivement suggèrent qu'il vaudrait la peine d'analyser par Western blot l'expression protéique de ces marqueurs afin de vérifier si la variation d'expression des messagers correspond à une régulation de l'expression protéique. L'effet des facteurs de croissance devraient idéalement être aussi étudiés dans ces conditions.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les facteurs de croissance de la famille de l'EGF jouent un rôle important dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes épidermiques. En effet, l'EGF a été détecté et isolé dans les glandes sous-maxillaires par Stanley Cohen (1960) par sa capacité à stimuler l'éruption des incisives et l'ouverture des paupières des souriceaux nouveaux-nés prouvant par là l'implication de ce facteur dans le développement de l'épiderme. Le récepteur HER1 est cependant relativement peu exprimé par les cellules différenciées de l'épiderme (Partridge et al., 1988 ; Damjanov et al., 1986 ; Kearsley et al., 1991) suggérant une implication principale des facteurs de croissance de la famille de l'EGF dans le contrôle de la prolifération des kératinocytes épidermiques. Des études *in vitro* ont d'ailleurs montré que dans les kératinocytes épidermiques, HER1 est exprimé et activé pour contrôler la prolifération, mais aussi la différenciation de ces cellules (Wille et al., 1984 ; Poumay et Pittelkow, 1995).

En culture autocrine adhérente, Poumay et Pittelkow (1995) ont démontré un rôle inhibiteur de l'EGF sur l'expression des kératines suprabasales 1 et 10 dans des kératinocytes épidermiques indiquant que l'EGF favorise un phénotype cellulaire non différencié dans ces conditions de culture. Par contre, une étude a démontré un effet pro-différenciateur de l'EGF lorsque les kératinocytes sont cultivés en suspension. Cet effet se traduit par une augmentation de l'expression des marqueurs de différenciation tardive (TGase1 et profilaggrine) liée à une réduction de l'expression d'un marqueur de différenciation précoce (kératine10)(Wakita et Takigawa., 1999). Ces observations allaient dans le même sens que des résultats préliminaires de notre laboratoire publiés uniquement sous forme d' « abstract » de conférence (Poumay et Pittelkow, 1996). En effet, cet effet pro-différenciateur de l'EGF, nous l'avons également constaté dans des conditions de suspension pendant 24 heures, par l'augmentation de l'expression d'un autre marqueur de différenciation tardive, l'involucrine. Nous avons ici, par nos expériences de suspension sur poly-HEMA, confirmé ces observations. Cependant, nous n'avons pas observé une augmentation de l'expression protéique de l'involucrine, suite à la mise en suspension et suite au traitement par l'EGF des kératinocytes épidermiques. Cette absence de la protéine involucrine peut peut-être s'expliquer par l'implication de l'involucrine dans la formation de l'enveloppe cornée de l'épiderme. En effet, durant la formation de cette enveloppe cornée, diverses protéines dont l'involucrine se conjuguent les unes aux autres dans une structure qui ne nous permet pas de détecter l'involucrine à l'aide d'un anticorps. La comparaison en immunofluorescence des kératinocytes cultivés en suspension avec ou sans traitement à l'EGF nous suggère malgré tout une certaine augmentation de l'expression de l'involucrine qui semble alors exprimée dans toutes les cellules traitées par l'EGF. Puisque simultanément l'EGF réduit l'expression des kératines 10 et 14, ainsi que l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 6$, nous pouvons proposer que l'EGF dans les conditions de suspension des kératinocytes épidermiques soit alors un facteur favorisant la différenciation cellulaire. Pourtant cet effet n'est pas généralisé pour tous les marqueurs de différenciation, car bien que l'expression de la profilaggrine soit induite par la mise en suspension des kératinocytes épidermiques, le traitement à l'EGF n'augmente pas son expression dans nos cultures, contrairement aux observations faites par Wakita et Takigawa. (1999). Cette divergence pourrait provenir soit du type de milieu utilisé et notamment de la concentration extracellulaire en calcium, soit de l'origine des kératinocytes épidermiques puisque nous utilisons des cellules adultes, soit du temps passé en suspension (24 heures versus 48 heures), soit enfin elle pourrait provenir d'autres raisons que nous ignorons encore.

Dans notre travail, nous avons donc vérifié d'une part que la perte d'adhésion des kératinocytes à leur matrice extracellulaire favorise la différenciation épidermique, et d'autre

part que la présence d'EGF dans ces conditions de culture favorise davantage cette différenciation épidermique. Une autre étude a de plus démontré que les interactions faisant intervenir les molécules d'adhésion intercellulaire de type cadhérine influencent l'expression de certains marqueurs de différenciation des kératinocytes (Hines et al., 1999) et pas d'autres. En effet, ces auteurs montrent que les interactions homotypiques via les cadhérines entre des kératinocytes suprabasaux réduisent l'expression de la profilaggrine, tandis qu'elles favorisent l'expression de la TGase1 et n'affectent pas l'expression de l'involucrine. Comme sa concentration détermine directement les interactions via les cadhérines, le calcium extracellulaire dans le milieu de culture semble dès lors un régulateur important de l'expression des marqueurs de différenciation puisqu'en fonction de sa concentration, il active ou non les cadhérines (Hines et al., 1999). Dès lors nous pensons qu'il serait intéressant d'étudier l'expression des marqueurs de différenciation épidermiques dans des kératinocytes cultivés en suspension en présence d'une concentration extracellulaire en calcium élevée (1 mM), permettant d'établir les jonctions intercellulaires. Dans ce cas, on pourrait étudier uniquement l'effet d'une perte d'attache à la matrice extracellulaire sur la différenciation des kératinocytes épidermiques, ainsi que l'effet des facteurs de croissance, puisque les jonctions intercellulaires seraient dès lors possibles.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux récepteurs de la famille HER dans le processus de différenciation et nous avons notamment observé que l'EGF est capable d'activer le récepteur HER2, probablement par hétérodimérisation avec HER1, dans des kératinocytes épidermiques cultivés en suspension. Nous avons aussi observé que cette activation est capable de propager le signal à l'intérieur de la cellule puisque nous avons détecté la stimulation de la voie des Erk. Par contre, nous avons aussi étudié les facteurs de type HRG. Ces facteurs de croissance constituent aussi d'importants régulateurs de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes épidermiques (Marikovsky et al., 1995 ; De Potter et al., 2001). Dans des kératinocytes épidermiques cultivés 24 heures en suspension, nous avons observé l'absence de variation de l'expression des marqueurs de différenciation après traitement à l'HRG. Or, les récepteurs de l'HRG (HER2 et HER3) sont déjà exprimés à sous-confluence et nous avons confirmé que leur expression augmente avec la différenciation de la cellule (De Potter et al., 2001) y compris dans la culture en suspension. L'analyse de l'activation du récepteur HER2 dans ces conditions de culture et de traitement nous a montré que l'HRG est apparemment incapable d'activer le récepteur HER2. Pour expliquer nos observations, il faut noter que le marquage en immunofluorescence de ces récepteurs dans les kératinocytes épidermiques a montré une localisation majoritaire du récepteur HER1 en membrane plasmique et par contre une localisation intracytoplasmique du récepteur HER2, ce qui est d'ailleurs en accord avec les résultats obtenus par Stoll et al. (2001). Manque ici la localisation du récepteur HER3, mais puisque le récepteur HER2 est intracytoplasmique, ce récepteur est peut-être inaccessible pour une hétérodimérisation. Par ailleurs, cela pourrait expliquer pourquoi l'EGF peut activer le récepteur HER2 par hétérodimérisation, car la liaison d'EGF au récepteur HER1 entraîne l'internalisation de celui-ci, et peut-être la rencontre avec HER2. Graham (2003) en effet décrit la possibilité d'une transduction de signaux après internalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase par voie d'endocytose. Une analyse de l'activation du récepteur HER3, ainsi que sa localisation nous permettrait sans doute de confirmer ou par contre d'infirmer cette interprétation.

Dans un premier temps, nous avons démontré que la mise en suspension pendant 24 heures des kératinocytes épidermiques humains favorise leur différenciation. Cette durée de 24 heures avait d'abord été choisie par analogie avec les 24 heures de suspension en méthylcellulose choisies par d'autres auteurs et notamment Watt et al. (2002).

Malheureusement, nous avons ensuite démontré que la mise en suspension sur poly-HEMA pendant 48 heures favorise de façon plus importante encore la différenciation épidermique, en accord avec les observations de Wakita et Takigawa (1999). Il serait dès lors plutôt intéressant d'étudier les effets des facteurs de croissance sur la différenciation des kératinocytes épidermiques lors de la culture en suspension pendant 48 heures. Nous n'avons pas eu le temps d'entreprendre cette étude dans le cadre de ce travail.

Quelques perspectives intéressantes ont cependant été suggérées par notre étude. Nous avons abordé différentes questions qui concernent le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire, surtout par l'analyse de l'expression de marqueurs de différenciation des kératinocytes épidermiques cultivés en suspension et en présence de facteurs de croissance. Nous avons ainsi pu vérifier que la culture en suspension induit la différenciation épidermique, ce qui est en accord avec ce qui est observé *in vivo* dès la perte d'adhésion des kératinocytes épidermiques à leur matrice extracellulaire. Nous pourrions aussi envisager l'utilisation d'un milieu de culture contenant une concentration en calcium plus élevée (1 mM) et qui dès lors permettrait la formation des jonctions intercellulaires et donc l'étude de l'influence de ces jonctions sur l'expression des marqueurs de différenciation. Dans le même ordre d'idée, l'utilisation d'anticorps spécifiques contre les cadhérines et bloquant leurs interactions, empêchant ainsi la formation des jonctions intercellulaires malgré une concentration extracellulaire en calcium élevée, permettrait également de vérifier l'influence de ces jonctions sur l'expression des marqueurs de différenciation épidermiques.

Le rôle joué par l'EGF lorsque les kératinocytes n'adhèrent plus à leur matrice extracellulaire semble bien être un rôle pro-différenciateur. L'utilisation d'inhibiteurs de certains intermédiaires de la voie de transduction du signal pourrait nous permettre de découvrir la/les voie(s) principale(s) activée(s) par la liaison de l'EGF à son récepteur dans les conditions de suspension des kératinocytes épidermiques. Il serait également intéressant de localiser le récepteur HER1 après stimulation avec l'EGF dans ces mêmes conditions de culture, afin de vérifier si l'internalisation de ce récepteur a bien lieu et peut-être le conduit à activer le récepteur HER2 par hétérodimérisation comme nous l'avons suggéré. Parallèlement, l'étude de l'activation et de la localisation du récepteur HER3 nous renseignerait sur son rôle éventuel lors d'une stimulation par l'HRG et nous apprendrait pourquoi HER2 ne semble pas activé dans ces conditions. De nombreuses études sont donc encore à réaliser afin d'améliorer notre compréhension sur le système heréguline-récepteurs dans les kératinocyte épidermiques humains cultivés en suspension.

BIBLIOGRAPHIE

Aaronson, S. A., Rubin, J. S., Finch, P. W., Wong, J., Marchese, C., Falco, J., Taylor, W. G. & Kraus, M. H.. Growth factor-regulated pathways in epithelial cell proliferation. *Am. Rev. Respir. Dis.* **142**, Suppl. : S7-S10 (1990).

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D.. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc. London. (1994).

Adams, J. C., & Watt, F. M..Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes. *Nature* **340**, 307-309 (1989).

Ando, Y. & Jensen, P. J.. Epidermal growth factor and insulin-like growth factor enhance keratinocyte migration. *J. Invest. Dermatol.* **100**, 633-639 (1993).

Balda, S. M. & Matter, K.. Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends in Cell Biol.* **13** (6), 310-318 (2003).

Bjorge, J. D. & Kudlow, J. E.. Epidermal growth factor receptor synthesis is stimulated by phorbol ester and epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **262**, 6615-6622 (1987).

Borradori, L. & Sonnenberg, A.. Hemidesmosomes : role in adhesion, signaling and human diseases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**, 647-656. (1996).

Boyce, S. T. & Ham, R. G.. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* **81**, 33s-40s (1983).

Burgeson, R. E. & Christiano, A. M.. The dermal-epidermal junction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 651-658 (1997).

Braga, V. M., Hajibagheri, N. & Watt, F. M.. Calcium-induced intercellular adhesion of keratinocytes does not involved accumulation of $\beta 1$ integrins at cell-cell contacts and does not involved changes in the levels or phosphorylation of catenins. *Cell Adhes. Commun.* **5**, 137-149 (1998).

Busfield, S. J., Michnick, D. A., Chickering, T. W., Revett, T. L., Ma, J. Y., Woolf, E. A., Comrack, C. A., Dussault, B. J., Woolf, J., Goodearl, A. D. J. & Gearing, D. P.. Characterization of a neuregulin-related gene, don-1, that is highly expressed in restricted region of the cerebellum and hippocampus. *Mol. Cell Biol.* **17**, 4007-4014 (1997).

Byyny, R. L., Orth, D. N. & Cohen, S. Radioimmunoassay of epidermal growth factor. *Endocrinology* **90**, 1261-1266 (1972).

Carraway, K.L. 3rd, Soltoff, S.P., Diamonti, A.J., & Cantley, L.C.. Heregulin stimulates mitogenesis and phosphatidylinositol 3-Kinase in mouse fibroblasts and transfected with erbB2/neu and erbB3. *J. Biol. Chem.* **270**, 7111-7116 (1995).

Carter, W. G., Kaur, P., Gil, S. G., Gahr, P. J. & Wayner, E. A. Distinct functions for integrins $\alpha 3\beta 1$ in focal adhesions and $\alpha 6\beta 4$ /bullous pemphigoid antigen in a new stable anchoring contact (SAC) of keratinocytes : relation to hemidesmosomes. *J. Cell Biol.* **111**, 3141-3154 (1990).

Chen, J. D., Kim, J. P., Zhang, K., Sarret, Y., Wynn, K. C., Kramer, R. H., & Woodley, D. T.. Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocyte locomotion on collagen by increasing the $\alpha 2$ integrin subunit. *Exp. Cell Res.* **209**, 216-223 (1993).

Chrysogelos, S. A. & Dickson, R. B.. EGF receptor expression, regulation, and function in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **29**, 29-40 (1994).

Clark, A. J. L., Ishii, S., Richert, N., Merlino, G. T. & Pastan, I.. Epidermal growth factor regulates the expression of its own receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 8374-8378 (1985).

Cohen, S.. Purification of the nerve-growth promoting protein from mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**, 302-311. (1960).

Cook, P. W., Mattox, P. A., Keeble, W. W., Pittelkow, M. R., Plowman, G. D., Shoyab, M., Adelman, J. P. & Shipley, G. D.. A heparin sulfate-regulated human keratinocyte autocrine factor is similar or identical to amphiregulin. *Mol. Cell Biol.* **11**, 2547-2557 (1991b).

Cook, P. W., Pittelkow, M. R. & Shipley, G. D.. Growth factor-independent proliferation of normal neonatal keratinocyte : production of autocrine- and paracrine-acting mitogenic factors. *J. Cell Physiol.* **146**, 277-289 (1991a).

Dajee, M., Tarutani, M., Deng, H., Cai, T. & Khavari, P. A.. Epidermal Ras blockade demonstrates spatially localized Ras promotion of proliferation and inhibition of differentiation. *Oncogene* **21**, 1527-1538 (2002).

Damjanov, I., Mildner, B. & Knowles, B.B.. Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor receptor in normal human tissues. *Lab. Invest.* **55**, 588-592 (1986).

De Potter, I.Y., Poumay, Y., Squillace, K.A. & Pittelkow, M.R.. Human EGF receptor (HER) family and heregulin members are differentially expressed in epidermal keratinocytes and modulate differentiation. *Exp. Cell Res.* **271**, 315-328 (2001).

Dougall, W. C., Qian, X., Peterson, N. C., Miller, M. J., Samanta, A. & Greene, M. I.. The neu-oncogene : signal transduction pathways, transforming mechanisms and evolving therapies. *Oncogene* **9**, 2109-2123 (1994).

Downer, C. S., Watt, F. M. & Speight, P. M.. Loss $\alpha 6$ and $\beta 4$ integrin subunits coincides with loss of basement membrane components in oral squamous cell carcinomas. *J. Pathol.* **171**, 183-190 (1993).

Eckert, R.L. & Green, H. Structure and evolution of the human involucrin gene. *Cell* **46**, 583-589 (1986).

Eckert, R.L., Crish, J.F. & Robinson, N.A. The epidermal keratinocyte as a model for the study of gene regulation and cell differentiation. *Physiol.Rev.* **77**, 397-424. Review (1997).

Elder, J. T. Transforming growth factor- α and related growth factors. *In* Epidermal Growth Factors and Cytokines (T. A. Luger et T. Schwarz, Eds.) 205-210 (1994). Dekker, New York.

Falls, D. L., Rosen, K. M., Corfas, G., Laane, W. S. & Fischbach, G. D.. ARIA, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family. *Cell* **72**, 801-815 (1993).

Farmer, E. R. & Hood, A. F.. *Pathology of the skin* 987 (1990). Appleton & Lange, Connecticut.

Fiddes, R.J., Janes, P.W., Sanderson, G.M., Sivertsen, S.P., Sutherland, R.C. & Daly R.Y. Heregulin (HRG) - induced mitogenic signaling and cytotoxic activity of a HRG/PE40 ligand toxin in human breast cancer cells. *Cell Growth Diff.* **6**, 1567-1577 (1995).

Frisch, S. M. & Francis, H.. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* **124**, 619-626 (1994).

Geiger, B. & Ayalon, O.. Cadherins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 307-332 (1992).

Goldman, D., Levy, R. B., Peles, E. & Yarden, Y.. Heterodimerization of erbB-1 and erbB-2 receptors in human breast carcinoma cells : a mechanism for receptor transregulation. *Biochemistry* **29**, 11024-11028 (1990).

Goodearl, A. D. J., Davis, J. B., Mistry, K., Minghetti, L., Otsu, M., Waterfield, M. D. & Stroobant, P.. Purification of multiple forms of glial growth factor. *J. Biol. Chem.* **268**, 18095-18102 (1993).

Graham, C.. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 143-148 (2003).

Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M. & Hynes, N. E.. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* **16**, 1647-1655 (1997).

Green, H.. Terminal differentiation of cultured human epidermal cells. *Cell* **11**, 405-416 (1977).

Green, K. J., Geiger, B., Jones, J. C. R., Talia, J. C. & Goldman, R. D.. The relationship between intermediate filaments and microfilaments before and during the formation of desmosome end adherens-type junctions in mouse epidermal keratinocytes. *J. Cell Biol.* **107**, 1389-1402 (1987).

Guy, P. M., Platko, J. V., Cantley, L. C., Cerione, R. A. & Carraway, K. L.. Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 8132-8136 (1994).

Haas, T. A. & Plow, E. F.. Integrin-ligand interactions : a year in review. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**, 656-662 (1994).

Harari, D. Tzahar, E., Romano, J., Shelly, M., Pierce, J. H., Andrews, G. C. & Yarden, Y. Neuregulin-4 : a novel growth factor that acts through the ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Oncogene* **18**, 2681-2689 (1999).

Harris, R. C., Chung, E. & Coffey, R. J.. EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res.* **284**, 2-13 (2003).

Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K. & Yuspa, S.H. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* **19**, 245-254 (1980).

Hines, M. D., Jin, H. C., Wheelock, M. J. & Jensen, P. J.. Inhibition of cadherin function differentially affects markers of terminal differentiation in cultured human keratinocytes. *J. Cell Sci.* **112**, 4569-4579 (1999).

Hogervorst, F., Admiraal, L.G., Kuikman, L., Janssen, H., Daams, H. & Sonnenberg, A.. Biochemical characterization and tissue distribution of the A and B variants of the integrin $\alpha 6$ subunit. *J. Cell Biol.* **121**(1), 179-191 (1993).

Holbrook, K. A. & Smith, L. T.. Morphology of connective tissue : structure of the skin and tendon. *In* Connective Tissue and Its Heritable Disorders (Royce, P.M. et Steinman, B., eds), 51-71 (1993), Wiley-Liss, New York.

Holmes, W. E., Sliwkowski, M. X., Akita, R. W., Henzel, W. J., Lee, J., Park, J. W., Yansura, D., Abadi, N., Raab, H., Lewis, G. D., Shepard, H. M., Kuang, W.-J., Wood, W. I., Goeddel, D. V. & Vandlen, R. L.. Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2. *Science* **256**, 1205-1210 (1992).

Hynes, R. O.. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25 (1992).

Jensen, P. J., Telegan, B., Lavker, R. M. & Wheelock, M. J.. E-cadherin and P-cadherin have partially redundant roles in human epidermal stratification. *Cell Tissue Res.* **288**, 307-316 (1997).

Jensen, U. B., Lowell, S. & Watt, F. M.. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole mount labelling and lineage analysis. *Development* **126**, 2409-2418 (1999).

Jones, J., Sugiyama, M., Watt, F. M. & Speight, P. M.. Integrin expression in normal, hyperplastic, dysplastic and malignant oral epithelium. *J. Pathol.* **169**, 235-243 (1993).

Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P. J., Ward, C. W. & Burgess, A. W.. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res.* **284**, 31-53 (2003).

Kaiser, H. W., Ness, W., Offers, M., O'keefe, E. & Kreysel, H. W.. Talin: adherens junction protein is localized at the epidermal-dermal interface in skin. *J. Invest. Dermatol.* **101**(6), 789-793 (1993).

Kearsley, T.H., Leonard, J.H., Walsh, M.D. & Wright, G.R.. A comparison of epidermal growth factor (EGFR) and c-erbB-2 oncogene expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Pathology* **23**, 189-194 (1991).

Krane, J. F., Murphy, D. P., Carter, D. M. & Krueger, J. G.. Synergistic effects of epidermal growth factor (EGF) and insulin-like growth factor I/somatomedin C (IGF-I) on keratinocyte proliferation may be mediated by IGF-I transmodulation on the EGF receptor. *J. Invest. Dermatol.* **96**, 419-424 (1991).

Kraus, M.H., Issing, W., Miki, T., Popescu, N.C. & Aaronson, S.A. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/ epidermal growth factor receptor family : Evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9193-9197 (1989).

Kudlow, J. E., Cheung, C-Y. M. & Bjorge J. D.. Epidermal growth factor stimulates the synthesis of its own receptor in a human breast cancer cell line. *J. Biol. Chem.* **261**, 4134-4138 (1986).

Laborda, J.. 36B4 cDNA used as an estradiol-independent mRNA control is the cDNA for human acid ribosomal phosphoprotein PO. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3998 (1991).

Levy, L., Broad, S., Diekmann, D., Evans, R. D. & Watt, F. M.. β 1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms. *Mol. Biol. Cell* **11**, 453-466 (2000).

Maguire, H. C., Jr., Jaworsky, C., Cohen, J. A., Hellman, M., Weiner, D. B. & Greene, M. I.. Distribution of neu (c-erbB-2) protein in human skin. *J. Invest. Dermatol.* **92**, 786-790 (1989).

Mainiero, F., Murgia, C., Wary, K. K., Curotola, A. M., Pepe, A., Blumemberg, M., Westwick, J. K. & Der, C. J.. The coupling of α 6 β 4 integrin to Ras-MAP kinase pathways mediated by Shc controls keratinocyte proliferation. *EMBO J.* **16**(9), 2365-2375 (1997).

Marchese, C., Rubin, J., Ron, D., Faggioni, A., Torrisi, M. R., Messina, A., Frati, L. & Aaronson, A.. Human keratinocyte growth factor activity on proliferation and differentiation of human keratinocytes : differentiation response distinguishes KGF from EGF family. *J. Cell Physiol.* **144**, 326-332 (1990).

Marchionni, M. A., Goodearl, A. D., Chen, M. S., Bermingham-McDonogh, O., Kirk, C., Hendricks, M., Danely, F., Misumi, D., Sudhalter, J., Kohayashi, K., & al.. Glial growth factor are alternatively spliced ErbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* **362**, 291-292 (1993).

Marikovsky, M., Lavi, S., Pinkas-Kramarski, R., Karunakaran, D., Liu, N., Wen, D. & Yarden, Y. ErbB-3 mediates differential mitogenic effects of NDF/heregulin isoforms on mouse keratinocytes. *Oncogene* **10**, 1403-1411 (1995).

McKee, P. H.. Normal histology of the skin. In *Pathology of the skin*, 1.3-1.21. Mosby-wolfe, Barcelona. (1996).

Menon, G. K., Grayson, S. & Elias, P. M.. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis : ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J. Invest. Dermatol.* **84** 508-512 (1985).

Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. & Krepler, R.. The catalog of human cytokeratins : patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**, 11-24 (1982).

Partridge, M., Gullick, W.J., Langdon, J.D. & Sherriff, M.. Expression of epidermal growth factor receptor on oral squamous cell carcinoma. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **26**, 381-389 (1988).

Peles, E., Bacus, S. S., Koski, R. A., Lu, H. S., Wen, D., Ogden, S. G., Levy, R. B. & Yarden, Y.. Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand : a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells. *Cell* **69**, 205-216 (1992).

Peles, E. & Yarden, Y.. Neu and its ligands : from an oncogene to neural factors. *BioEssays* **15**, 815-34 (1993).

Peles, E., Ben-Levy, R., Tzahar, E., Liu, N., Wen, D. & Yarden, Y.. Cell-type specific interaction of Neu differentiation factor (NDF/herregulin) with Neu/HER-2 suggests complex ligand-receptor relationships. *EMBO J.* **12**, 961-971 (1993).

Pittelkow, M. R., Cook, P. W., Shipley, G. D. & Derynck, R., Coffey, R. J. Jr.. Autonomous growth of human keratinocytes requires epidermal growth factor receptor occupancy. *Cell Growth Diff.* **4**, 513-521 (1993).

Plowman, G. D., Culouscou, J. M., Whitney, G. S., Green, J. M., Carlton, G. W., Foy, L., Neubauer, M. G. & Shoyab, M.. Ligand specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1746-1750 (1993).

Poumay, Y., Boucher, F., Degen, A. & Leloup, R.. Inhibition of basal cell proliferation during storage of detached cultured epidermal keratinocyte sheets. *Acta. Dermatol. Venereol (Stockh.)*. **71**, 195-198 (1991).

Poumay, Y., Boucher, F., Leclercq-Smekens, M., Degen, A. & Leloup, R.. Basal cell adhesion to a culture substratum controls the polarized spatial organization of human epidermal keratinocytes into proliferating basal and terminally differentiating suprabasal populations. *Epith. Cell Biol.* **2**, 7-16 (1993).

Poumay, Y. & Pittelkow, M.R.. Cell density and culture factors regulate keratinocyte commitment to differentiation and expression of suprabasal K1/K10 keratins. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 271-216 (1995).

Poumay, Y.& Pittelkow, M. R.. Regulation of K1/K10 keratins and involucrin expression in cultured keratinocytes: differential effects of epidermal growth factor. *J. Invest. Dermatol.* **107**(577), 902 (1996). Abstract.

Poumay, Y., Herphelin, F., Smits, P., De Potter, I.Y. & Pittelkow, M.R. High-cell-density phorbol ester and retinoic acid upregulate involucrin and downregulate suprabasal keratin 10 in autocrine cultures of human epidermal keratinocytes. *Mol. Cell Biol. Res. Commun.* **2**, 138-144 (1999).

Prigent, S. A. & Lemoine, N. R.. The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog. Growth Factor Res.* **4**, 1-24 (1992).

Rheinwald, J. D. & Green, H.. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. *Cell* **6**, 317-330 (1975).

Roop, D.R., Krieg, T.M., Mehrel, T., Chen, C.K. & Yuspa, S.H. Transcriptional control of high molecular weight keratin gene expression in multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* **48**, 3245-3252 (1988).

Schwab, M., Alitalo, K., Varmus, H.E., Bishop, J.M. & Georges, D. A cellular oncogene (c-k-ras) is amplified, overexpressed and located with karyotypic abnormalities in mouse adrenocortical tumor cells. *Nature* **303**, 497-501 (1983).

Shipley, G. D., Pittelkow, M. R., Wille, J. J., Jr., Scott, R. E. & Moses, H. L.. Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type beta transforming growth factor-growth inhibitor in serum-free medium. *Cancer Res.* **46**, 2068-2071 (1986).

Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A. & Press, M. F.. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in breast and ovarian cancer. *Science* **244**, 707-712 (1989).

Sliwkowski, M.X., Schaefer, G., Akita, R.W., Lofgreen, J.A., Fitzpatrick, V.D., Nuijens, A., Fendly, B.M., Cerione, R.A., Vandlen, R.L. & Carraway, K.L., III. Coexpression of erbB2 and erbB3 proteins reconstitutes a high affinity receptor for heregulin. *J. Biol. Chem.* **269**, 14661-14665 (1994).

Stoll, S.W., Kansra, S., Peshick, S., Fry, D.W., Leopold, W.R., Wiesen, J.F., Sibilio, M., Zhang, T., Werb, Z., Derynck, R., Wagner, E.F. & Elder, J.T.. Differential utilization and localization of ErbB receptor tyrosine kinases in skin compared to normal and malignant keratinocytes. *Neoplasia* **3**, 339-350 (2001).

Thivolet, J.. La peau de remplacement. *Pour la Science* 16-22 (1986).

Tsao, M.C., Walthall, B.J. & Ham, R.G. Clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in a defined medium. *J. Cell. Physiol.* **110**, 219-229 (1982).

Ullrich, A., Coussens, L., Hayflick, J. S., Dull, T. J., Gray, A., Tam, A. W., Lee, J., Yarden, Y., Liberman, T. A., Schlessinger, J. & al.. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* **309**, 418-425 (1984).

Waikel, R. L., Kawachi, Y., Waikel, P. A., Wang, X. J. & Roop, D. R.. Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nat. Genet.* **28**, 165-168 (2001).

Wakita, H. & Takigawa, M.. Activation of epidermal growth factor receptor promotes late terminal differentiation of cell-matrix interaction - disrupted keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **274** (52), 37285-37291 (1999).

Watt, F. M. & Hertle, M. D.. Keratinocyte integrins. In Leigh, I. M., Lane, E. B. & Watt, F. M. (eds). The keratinocyte Handbook. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 153-164 (1994).

Watt, F. M., Kubler, M.-D., Hotchin, N. A., Nicholson, L. J. & Adams, J. C.. Regulation of keratinocyte terminal differentiation by integrin-extracellular matrix interaction. *J. Cell Sci.* **106**, 175-182 (1993).

Watt, F.M. NEW EMBO MEMBER'S REVIEW : role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J.* **21**, 3919-3926 (2002).

Wells, A.. Tumor invasion : role of growth factor-induced cell motility. *Adv. Cancer Res.* **78**, 31-101 (2000).

Wen, D., Peles, E., Cupples, R., Suggs, S. V., Bacus, S. S., Luo, Y., Trail, G., Hu, S., Silbiger, S. M., Ben-Levy, R., Koski, R. A., Lu, H. S. & Yarden, Y.. Neu differentiation factor : A transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit. *Cell* **69**, 559-572 (1992).

Wen, D., Suggs, S. V., Karunagaran, D., Liu, N., Cupples, R. L., Luo, Y., Janssens, A. M., Ben-Baruch, N., Trollinger, D. B., Jacobsen, V. L., Meng, S.-Y., Lu, H.S., Chang, D., Yang, W., Yanigahara, D., Koski, R. A. & Yarden, Y.. Structural and functional aspects of the multiplicity of neu differentiation factors. *Mol. Cell Biol.* **14**, 1909-1919 (1994).

Wiley, H. S.. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp. Cell Res.* **284**, 78-88 (2003).

Wille, J.J., JR, Pittelkow, M.R., Shippley, G.D. & Scott, R.E. Integrated control of growth and differentiation of normal human prokeratinocytes cultured in serum-free medium : clonal analyses, growth kinetics, and cell cycle studies. *J. Cell Physiol.* **121**, 31-44 (1984).

Woodley, D.T.. Re-epithelialization. In The molecular and cellular biology of wound repair, 2nd edn. (Clark, R.A.F., ed), 339-350 (1996), Plenum publishing, New York.

Xian, W., Rosenberg, M. P. & DiGiovanni, J..Activation of erbB2 and c-src in phorbol ester-treated mouse epidermis : Possible role in mouse skin tumor promotion. *Oncogene* **14**, 1435-1444 (1997).

Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Myojima, N., Saito, T. & Toyoshima, K. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* **319**, 230-234 (1986).

Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X..Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 127-137. (2001).

Yuspa, S.H., Koehler, B., Kulesz-Martin, M. & Hennings, H. Clonal growth of mouse epidermal cells in medium with reduced calcium concentration. *J. Invest. Dermatol.* **76**, 144-146 (1981).

Zhang, D., Sliwkowski, M. X., Marck, M., Franz, G., Akita, R., Sun, Y., Hillan, K., Crowley, C., Brush, J. & Godowski, P. J.. Neuregulin-3 (NRG3) : a novel neural tissue-enriched protein that binds and activates ErbB4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9562-9567 (1997).